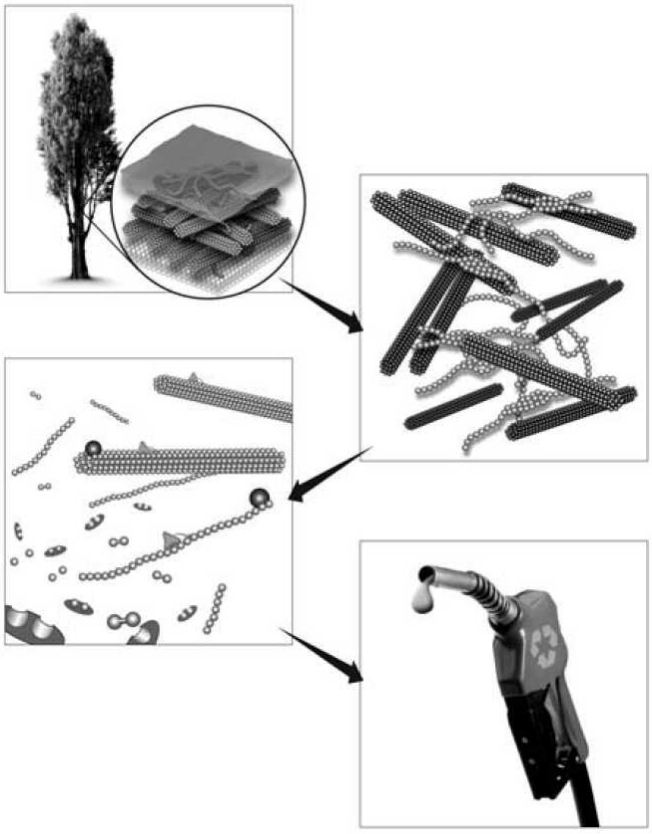


Biotechnology Explorer™

Biofuel Enzymeキット

実習用テキスト

カタログ番号

166-5035JEDU

注：このキットには温度感受性の試薬が含まれています。届いたらすぐに開封し、指示にしたがってキット内容を 4°C で保管してください。

テキストのどの部分をコピーしても構いませんが、授業にのみ使用してください。

BIO-RAD

先生方へ

1859年にペンシルベニア州のドレーク油田で採掘されて以来、石油などの化石燃料は輸送のためのエネルギー源として広く利用されてきました。初期の燃焼機関はエタノールで走るよう設計されていましたが、テキサスで新たな油田が発見され石油の価格が下がったこと、また後には政治的な後押しにより、石油は主要な燃料源となりました。しかし化石燃料の供給には限りがあるため減少しており、さらにこの燃焼が環境に与える影響も懸念されるため、石油に代わる持続可能で安価な燃料も求められています。

我々が抱えている燃料問題や、ほかの燃料を使った場合の環境への影響についてどのように取り組んでいくかという問題は、生徒たちの想像力をかき立てるものになります。このキットによって、輸送燃料としてセルロースからエタノールの製造に使用される酵素の1つ、「セロビアーゼ」に関する掘り下げた指導を行うことができます。生徒たちはキットに含まれるセロビアーゼと発色基質を使用し、酵素が反応速度を高める能力や、pH、温度、基質濃度および酵素濃度といった要素が酵素活性と反応速度に及ぼす影響を明らかにしていきます。

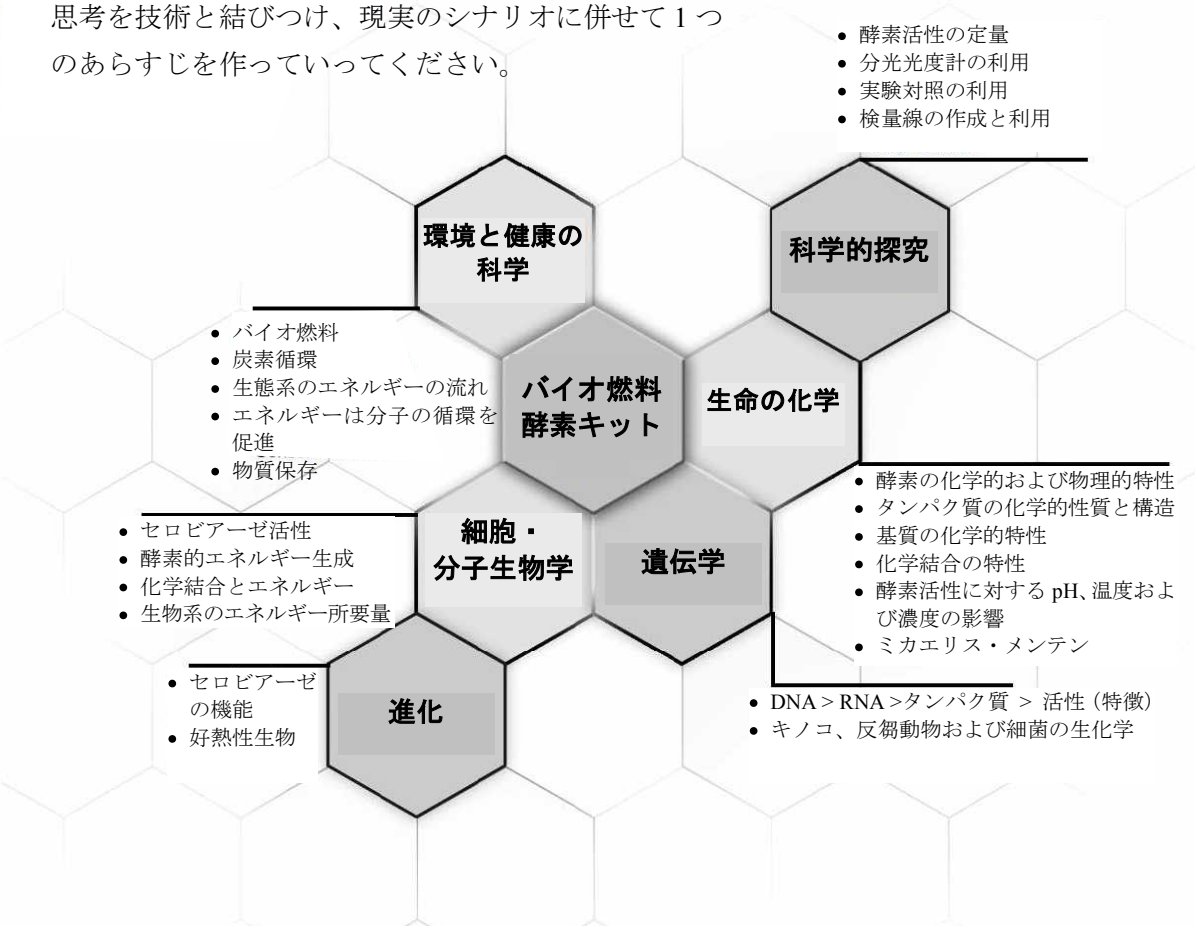
さらに生徒たちは、キノコからの抽出液が発色基質を分解する能力を分析し、生徒独自の実験を行うこともできます。このことは、バイオ燃料生産のための新たな酵素の研究と発見、また酵素反応の最適化に関する議論への扉を開くことになるでしょう。生徒たちはバイオ燃料に照らして酵素の機能を学ぶことになりますから、この独立した試験は炭素循環について、燃料と食物の比較について、餌としての食物の利用、またサステナブルな燃料生産法とは何かについて、議論する機会ともなります。

生徒たちはこのような研究を進めることによって、酵素反応速度に影響する要素を決定する実験の実施に関して、実用的な知識を得ることにもなります。このような研究はどのようなクラス環境にも合うように設計されており、特殊な装置は必要ありません。比色分析によって生成物の産生を追跡できますから、生徒たちは反応の進行を直接目で見ることが可能になります。さらに、もし分光光度計が利用できるのであれば、生徒たちは定量的測定についても理解することができます。

この授業カリキュラムは、ハワイ・プナホウスクールのDiane Sweeney先生の協力のもと開発されました。先生の多大なご指導と授業へのご提案に感謝申し上げます。

論理的に。学習を強化。時代に沿って。

新たな科学的な発見や技術により教えるべき内容は増えていきますが、時間は増えません。Biotechnology Explorer キットは､1 回の実験に複数の重要な内容を統合させていますので、より効果的な指導ができます。思考を技術と結びつけ、現実のシナリオに併せて 1 つのあらすじを作っていってください。



目　次

ページ

キットの概要 **1**

キット内容チェックリスト **2**

先生方へ（背景説明） **4**

先生に準備していただくもの **11**

試薬原液の調製 11
全実験の初期設定 13
実験1： 酵素の存在下／非存在下での反応速度の決定 14
実験2： 反応速度に対する温度の影響の決定 14
実験3： 反応速度に対するpHの影響の決定 15
実験4： 反応速度に対する酵素濃度の影響の決定 16
実験5： 反応速度に対する基質濃度の影響の決定 17
実験6： キノコ抽出液の反応速度上昇能の検討 17

典型的な授業結果 **18**

ヒントとよくある質問 **24**

クイックガイド

実験1： 酵素の存在下／非存在下での反応速度の決定 26
実験2： 反応速度に対する温度の影響の決定 28
実験3： 反応速度に対するpHの影響の決定 30
実験4： 反応速度に対する酵素濃度の影響の決定 31
実験5： 反応速度に対する基質濃度の影響の決定 33
実験6： キノコ抽出液の反応速度上昇能の検討 35

生徒用テキスト

背景 37
実験1： 酵素の存在下／非存在下での反応速度の決定 42
実験2： 反応速度に対する温度の影響の決定 52
実験3： 反応速度に対するpHの影響の決定 58
実験4： 反応速度に対する酵素濃度の影響の決定 63
実験5： 反応速度に対する基質濃度の影響の決定 69
実験6： キノコ抽出液の反応速度上昇能の検討 76

付録A：酵素キネティクス **82**

付録B：バイオ燃料 **86**

付録C：SmartSpec™ Plusスペクトロフォトメーターの設定 **89**

付録E：用語集 **95**

付録F：バイオ燃料について議論する **96**

付録G：先生用答案ガイド **98**

付録H：参考資料および追加資料 **106**

キットの概要

Biofuel Enzymeキットは、透明な基質から色のついた生成物への変換速度を高める、酵素の能力を調べます。このキットには、8グループの生徒が、セロビアーゼ酵素の存在下／非存在下で糖基質（p-ニトロフェニル・グルコピラノシド）がp-ニトロフェノールとグルコースに変換される速度を調べ、計算するのに十分な材料が含まれています。さらに、pH、酵素濃度、基質濃度および温度といった様々な条件が、酵素触媒反応速度に及ぼす影響を調べるために十分な材料も提供されています。加えてこのキットでは、セロビアーゼ活性に対する真菌起源の物質の作用を検討する、生徒独自の試験を行わせることもできます。

- 実験1： 酵素の存在下／非存在下での反応速度の決定
- 実験2： 反応速度に対する温度の影響の決定
- 実験3： 反応速度に対するpHの影響の決定
- 実験4： 反応速度に対する酵素濃度の影響の決定
- 実験5： 反応速度に対する基質濃度の影響の決定
- 実験6： キノコ抽出液の反応速度上昇能の検討

セロビアーゼは、バイオ燃料産業で活発に検討され生成されている、集合的にセルラーゼとして知られる酵素グループの一部です。これらの酵素は、複雑な高分子の糖鎖「セルロース」を分解することができます。セロビアーゼは、反芻動物、シロアリ、一部の植物や植物産物に存在する菌類と細菌により生産される、天然産物です。これを使って食用／餌用でない植物産物（トウモロコシ茎葉、スイッチグラスおよび廃木材や、ポプラなどの成長の早い木など）を分解し、化石燃料に代わるエタノール燃料を生産する研究が進められています。この Biofuel Enzyme キットでは、糖化合物である p-ニトロフェニル・グルコピラノシドからグルコースと p-ニトロフェノールへの分解速度を高めるため、セロビアーゼ酵素を利用しています（図 1）。p-ニトロフェノールは黄色の物質なので、溶液の色の強さの変化を調べることで、この酵素活性が間接的に測定されます。

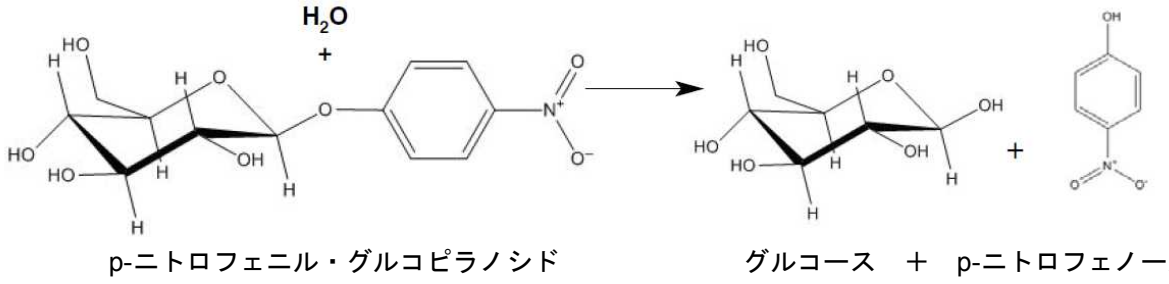


図1. p-ニトロフェニル・グルコピラノシドの切断により生成物としてグルコースとp-ニトロフェノールが生じる

酵素の非存在下ではこの反応は非常に遅い速度で進むが、β－グルコシドの活性をもつ酵素の存在下では、検出できるほどの速度で生じる。

保存について

到着後の試薬は冷蔵庫（4°C）で保存し、1 週間以内に使用してください。試薬原液を調製したら、この希釈液／再構成液を 4°C で保存し安定性を確保してください（一度にすべての実験をしない場合）。希釈した酵素は 4°C で 1 週間安定です。再構成した基質と標準液は 4°C で 1 ヵ月安定です。1 倍に希釈した反応停止液、再懸濁バッファーおよび抽出用バッファーは 4°C で長期間安定（目安 3 年間）です。

キット内容チェックリスト

このセクションでは、Biofuel Enzyme キットに含まれる内容をリストにしています。必要な付属部品も記載しています。またそれぞれのキットには、8 グループの生徒（1 グループ 4 人）に対して十分な材料が含まれています。キットが届き次第開封し、リストにある部品を確認してキットを十分把握しておいてください。酵素、基質、標準液およびバッファーの入った袋は、ただちに冷蔵庫（4°C）に保存してください。

キット構成内容	数量	（✓）
4°Cで保存		
（酵素）セロビアーゼ、400 µL	1バイアル	❒
（基質）p-ニトロフェニル・グルコピラノシド、90 mg	1バイアル	❒
（標準液）p-ニトロフェノール（1 mM、4 mL）	1ボトル	❒
反応停止液（2x）100 mL	1ボトル	❒
再懸濁バッファー（10x）50 mL	1ボトル	❒
抽出用バッファー　50 mL	1ボトル	❒
室温保存		
ディスポーザブルピペット（DPTP）	40	❒
1.5 mLマイクロチューブ	90	❒
15 mLコニカルチューブ	50	❒
1.5 mLスタンダードディスポーザブルキュベット、100本入り	1箱	❒
取扱説明書（英語）	1冊	❒

必要なアクセサリ部品（キットには含まれていません）	1キットあたりの必要数	（✓）
先生方に準備していただくもの、または実験装置		
再懸濁バッファー（1倍濃度）調製用の500 mLボトル	1	❒
反応停止液（1倍濃度）調製用の200 mLボトル	1	❒
高濃度酵素溶液調製用の100 mLボトル	1	❒
低濃度酵素溶液調製用の100 mLボトル	1	❒
3 mM基質調製用の100 mLボトル	1	❒
1.5 mM基質調製用の150 mLボトル	1	❒
標準液調製用の50 mLチューブまたはボトル	5	❒
4～450 mLを計る血清用ピペッターおよびピペット、またはメスシリンダー		
脱イオン水または蒸留水	1,000 mL	❒
実験用テープ（セロテープではない）	1	❒
天秤（実験6用）	1	❒

生徒の実験台に用意するもの（4人一組）	実験台あたりの数	（✓）
すべての実験		
マーカーペン	1	❒
タイマーまたはストップウォッチ	1	❒
実験2：反応速度に対する温度の影響の決定		
37°Cの水が入ったビーカー	1	❒
砕いた氷の入ったビーカーまたはアイスバケット	1	❒
温度計	1	❒

生徒の実験台に用意するもの（4人一組）	実験台あたりの数	（✓）
実験6：キノコ抽出液の反応速度上昇能の検討		
乳鉢と乳棒	1	❒
秤量皿と分包紙	1	❒
ろ紙、こし布またはこし器	1	❒

オプションのアクセサリ部品	数量
100～1,000 µL容量可変式マイクロピペット	8
100～1,000 µLピペットチップ	8
SmartSpec™ Plusスペクトロフォトメーター（カタログ#170-2525）	
または同等品	1
ウォーターバス	1
デジタルドライバス	1
DyNA Chillクーラー（フナコシにて取扱）または同等品	1
インキュベーター	1
ミニ遠心機	1

予定所用時間

全6回の実験を行うためには、50分授業で約3コマを必要としますが、これは実験時間内に結果を分析するか否かによっても異なります。これらの実験を始める前には、1〜2日間の背景の復習と講義を行うこともお勧めします。

実験を始める前に

- マニュアルを読む（2時間）
- 必要なアクセサリ部品の確認（1時間）
- 先生方が実験前の準備を行う－試薬原液の調製と全実験の初期設定（2時間）
- 先生方が実験前の準備を行う－1回分の実験のため（15〜45分）
- 生徒の実験台の準備（15分）

50 分単位の授業の場合

- 実験1：酵素の存在下／非存在下での反応速度の決定（45分）
- 実験2〜5：毎回の実験では、反応速度に対する温度、pH、酵素または基質濃度の影響を決定する。
- 実験6：キノコ抽出液の反応速度上昇能を検討する（30分）。

90 分単位の授業の場合

- 酵素の存在下/非存在下での反応速度を決定し、反応速度に対する温度とpHの影響を決定する（90分）。
- 反応速度に対する酵素および基質濃度の影響を決定し、キノコ抽出液が反応速度を上昇させるかを検討する（90分）。

安全上の注意

実験エリアでの飲食、喫煙、化粧は認められません。防護メガネと手袋の使用を強くお勧めします。実験の前後には石鹸を使って手洗いをさせてください。実験で強塩基性溶液（反応停止液、pH 9.5）を使用する場面がありますので、安全手順に従っているか確認してください。溶液が目に入った場合は、水で 15 分間洗い流してください。白衣などの防御服を着用し、塩基がこぼれたときケガをしないようにしてください。生徒独自の試験としてキノコを使用する場合は、**食料品店で購入したサンプルのみを使用させてください。**採取した野生のキノコは絶対に使用しないでください。

先生方へ（背景説明）

Biofuel Enzymeキットは、セロビアーゼ酵素活性を測定し、本酵素が働く至適条件を特定できるキットです。このセロビアーゼによるセロビオース分解反応は、石油に代わる効率的で持続可能な燃料である「セルロース系エタノール」の製造プロセスに重要な反応です。簡単に反応のセットアップができ、信頼性の高い、定量可能なデータを得ることができます。この酵素を実際に応用することで、生徒たちは実体験を通して、酵素反応に関わる抽象的な概念を理解することができるでしょう。

酵素とは

酵素とは、化学反応を加速する物質です。基質と化学的に反応するものではないため、反応物から生成物への変換を何度でも助けることができます。通常は特定の3次元構造をもつタンパク質です（核酸をベースとした酵素も一部存在します）。このタンパク質のくぼみが活性部位となり、ここで化学反応が起きます。酵素活性にはアミノ酸のR基（可変的な側鎖）の電荷と配位が重要です。活性部位は反応物との結合が生じるところなので、その特性が重要になります。酵素触媒反応の反応物を「基質」と呼びます。活性部位に面したアミノ酸は、基質の化学基に引き寄せられることから、基質は活性部位にぴったりと入ります。

反応の遷移状態が安定するような位置に基質がおかれることで、酵素は化学反応を加速します。酵素は、反応が生じるために必要なエネルギー（活性化エネルギー）を低下させます。活性化エネルギーが低下すると、化学反応はさらに早い速度で進みます。

塩分濃度とpHが変化すると、活性部位にある側鎖の電荷に影響し、基質への親和性に作用することで酵素の作用は劇的に低下します。温度も反応速度に影響することがあります。高温になると溶液中の基質と酵素分子の運動速度が上がり、分子間の衝突回数が増え、その結果反応速度も上昇します。しかし、ある温度まで達すると、酵素のアミノ酸同士の非共有結合が分解し始め、酵素の形状が変化します。酵素の形状が変化する（変性する）温度は、その酵素の特性によって異なります。沸点に近い温度でも基質から生成物への変換を効率的に行える酵素もありますが、室温で変性するものもあります。ただし、ほとんどの酵素は中程度の温度（20～40℃）で最もよく働きます。

酵素活性の至適な実験条件は、本来それが機能している条件を考えることで、予測することができます。例えば、温泉に生息している細菌が生成する酵素は高温でもっともよく働き、人間の胃で生成される酵素は、非常に低いpHでもっともよく働きます。

また、反応にかかわるすべての分子の相対濃度も反応速度に作用します。酵素濃度が高いほど（酵素が過剰な状態になるまで）、反応速度も速くなります。同様に基質濃度が高いほど（存在するすべての酵素が基質で飽和するまで）、反応速度も速くなります。作業者（酵素）が原料（基質）から製品を製造すると考えれば、分かりやすいかもしれません。作業者の数が多いほど製造される製品量は増えますが、作業者が多すぎ、原料が足りなくなると、それ以上は速く進みません。同様に、作業者の数を一定に保ちながら原料量を増やせば製造速度は速まりますが、作業者数に対して原料量が過剰になると、それ以上は速く進みません。一定濃度の作業者（酵素）と原料（基質）があるとき、生成物が得られる最高速度というものがあります。生化学の用語で「V_{max}」と呼ばれるものです。酵素キネティクスの詳細は付録Aをご覧ください。

生徒たちはこのキットを使って、セロビオースをグルコースに分解する酵素であるセロビアーゼについて、その反応速度を調べることができます。さらに、温度、pH、酵素濃度および基質濃度がセロビアーゼ活性にどのように影響するかも分析することができます。

セルラーゼを産生している生物

植物の細胞壁に認められる構造多糖類である「セルロース」は、セルラーゼとして知られる酵素ファミリーを産生する生物に対して、糖の供給源となる物質です。セルラーゼは、セルロースからグルコースへの分解プロセスを触媒します。ヒトやそのほかの動物はセルラーゼを産生していません。植物を摂取する動物の多くは、このような酵素をもつ生物の宿主になっています。例えば、シロアリの腸内には原生動物であるTrichonymphaが生息しています。TrichonymphaにはRs-D17と呼ばれる細菌が寄生しており、これが（木材の主成分である）セルロースを分解するセルラーゼ酵素を産生しています（http：//www.genomeweb.com/genome-termite-gut- bacteria- sequenced; http：//www.sciencelinks.jp/content/view/826/258）。また牛などの反芻動物には、それが摂取した植物を分解する嫌気性微生物が生息しています。そのうちBacteroides succinogenesは、セルラーゼを産生する一般的な牛の腸内細菌です（http：//sci.waikato.ac.nz/farm/content/microbiology.htmL）。分解者である菌の多くは、セルロースを多く含む細胞壁からその食物のほとんどを得ています。糸状菌であるAspergillus nigerはセルラーゼを産生し、その菌糸から浸出させて周囲のセルロースを分解し、その食物源としています。

セルロース系エタノール：セルラーゼの実用化

バイオ燃料産業ではセルラーゼを利用して、植物の細胞壁に含まれるセルロースをグルコースなどの糖類に変換させています。この糖類はさらに、微生物発酵によりエタノールに変換されます。このエタノールが、一部のエンジンでは単独で使用され、また一部ではガソリンと一緒に燃焼されて、自動車、トラック、飛行機などの燃料源として利用されます。セルロース系エタノールの生産工程の詳細を理解するためには、細胞壁の生化学的構造を理解することが役立つでしょう。植物のバイオマスはほとんどが細胞壁物質です。植物の細胞壁は様々な多糖類とそのほかの成分から構成されていますが、その主成分はセルロースです。セルロースはグルコース分子の非常に長い鎖から作られています。1つのセルロース分子は、それに含まれるグルコース分子間の水素結合により他のセルロース分子とつながります。このような結合によって、60～80のセルロース鎖からなるセルロースミクロフィブリルが形成されます。

成熟した植物細胞は生細胞であることも死細胞であることもあります。葉に含まれて光合成をしている葉肉細胞など、生存している植物細胞ではその周囲は一次細胞壁に囲まれています。一次細胞壁は、セルロースミクロフィブリルが他の多糖類やたんぱく質の基質中に埋もれた形になっています。これらの細胞壁は薄く、比較的伸縮性があり、伸長することができます。葉に認める大半の細胞のように、一次細胞壁のみをもつ細胞は、かなり柔らかい性質を持っています。

その他の植物細胞は成熟時には死細胞になっています。これは構造を強化して、植物内に水を通す働きをします。このような植物細胞は死ぬ前に、二次細胞壁と呼ばれる2番目の種類の細胞壁を発達させます。二次細胞壁は一次細胞壁より硬くなっています。二次細胞壁をもつ植物組織は、木部（ココナッツやクルミの種子を覆っている繊維状または硬化組織）およびセロリの茎の筋部分などの、水を輸送する組織を持っています。このような細胞壁には、その強度に影響する、セルロース以外の分子も含まれています。木質または繊維状の植物組織の二次細胞壁には、ヘミセルロースとリグニンも多量に認められます。リグニンはセルラーゼの酵素活性を阻害するため、セルロース系エタノールを製造するためにはこれを取り除く必要があります。またヘミセルロースは、セルロースの酵素的分解ができるようセルロースから切断しておく必要があります。

以下の 3 つの作業を進めることで、植物材料からエタノールを製造することができます（図 2）。

1. **前処理：**リグニンなど、セルロース以外の生物分子を除去する。
2. **酵素による加水分解：**セルラーゼによりセルロースを6種類の糖に加水分解する。また酵素を追加してヘミセルロースを5種の糖に加水分解することもできる。
3. **微生物発酵：**生成した糖をエタノールに変換する。

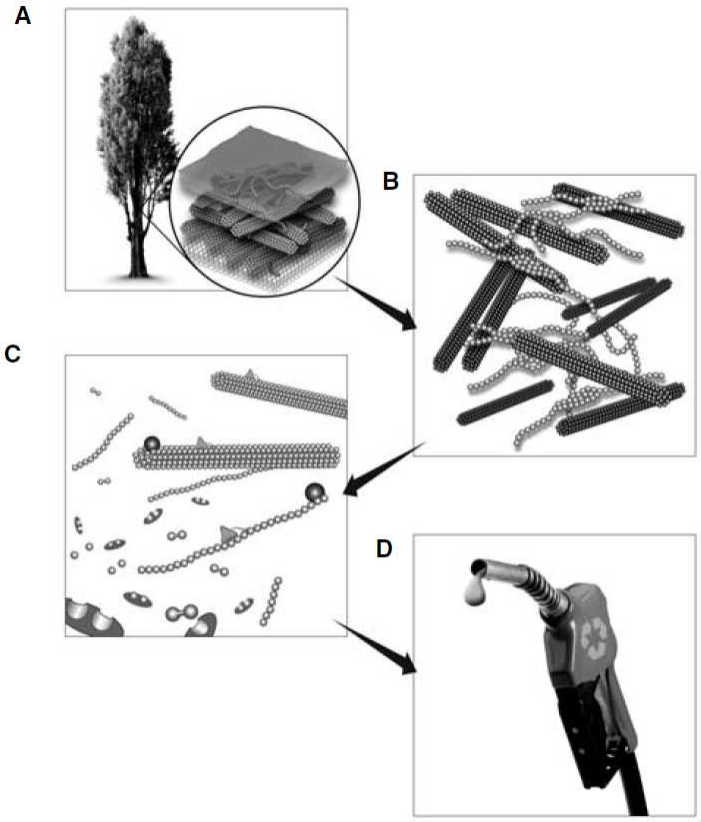


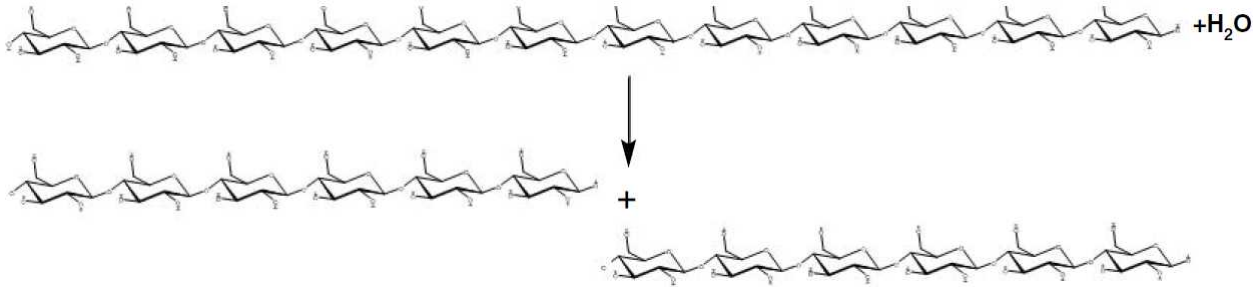
図2.　セルロース系エタノールの製造工程

A. ポプラの木、スイッチグラス、トウモロコシ茎葉などの原料からセルロースを採取する。B. これらの植物材料から熱処理、物理的破砕、酸／塩基処理によりセルロースを分離する。理想的には、セルロースの分解に干渉するリグニンなど他の成分からセルロースが分離されることが望ましい。
C. 酵素的にセルロースをグルコースに分解する。
D. グルコースを発酵させてエタノールにし、燃料として加工する。

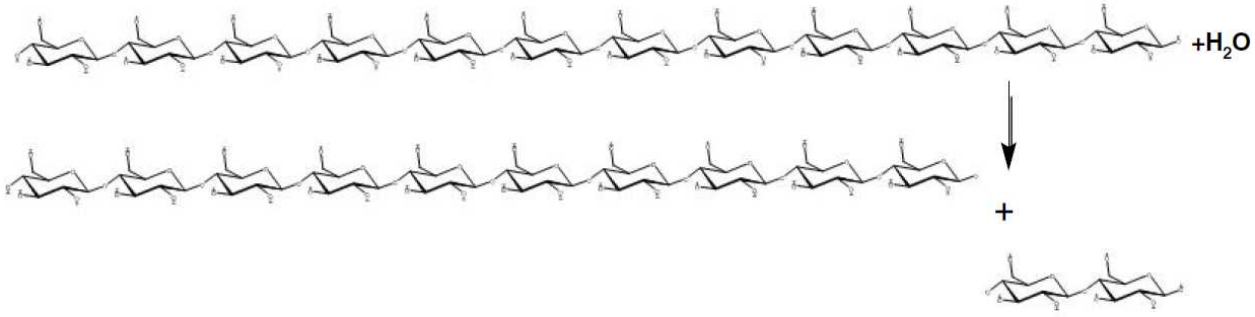
植物の細胞壁をグルコースに分解するために必要な、セルラーゼの種類

植物原料からのエタノール製造手順は、複数のステップを必要とする非常に複雑なものです。まず機械的に植物原料を処理し、酸や酵素処理を行い、熱を加えてリグニンを取り除きます。リグニンは、繊維質および木質の植物組織の二次組織壁に多量に認められ、セルロースと密に会合している、非常に複雑で芳香性の高分子です。リグニンを除去した後には、セルロースは露出が進み、分解されやすくなると思われます。セルロースのグルコースへの分解は、3種類の酵素により3段階で進みます。

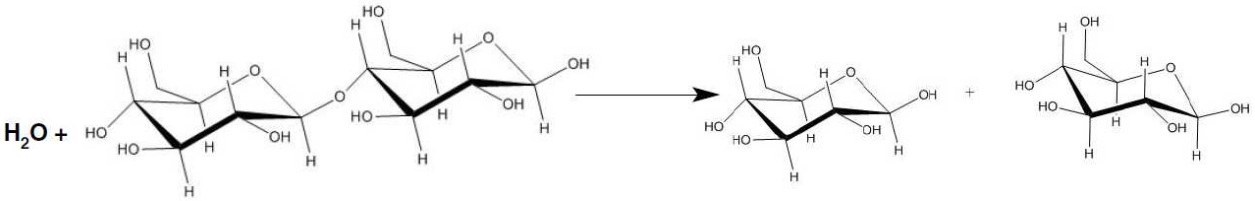
- エンドセルラーゼーセルロースを形成しているグルコース分子長鎖の内部結合を分解します。



- エクソセルラーゼーセルロース分子の末端にあるセルロースのグルコース単位間の共有結合を分解し、セロビオースを放出する



- セロビアーゼ（β-グルコシダーゼ）ー以上の2酵素で残されたセロビオースを分解する



セロビアーゼ酵素

このキットにも含まれているセロビアーゼ酵素は、セロビオース（1,4β–グルコシド結合でつながる2つのグルコース分子からなる二糖類）を分解します（図3）。このセロビアーゼによるセロビオースの分解は、セルロースからのグルコース生成の最終段階に相当します。
グルコースは、エタノールを生成する追加的酵素反応である微生物発酵に、よく使われている糖です。

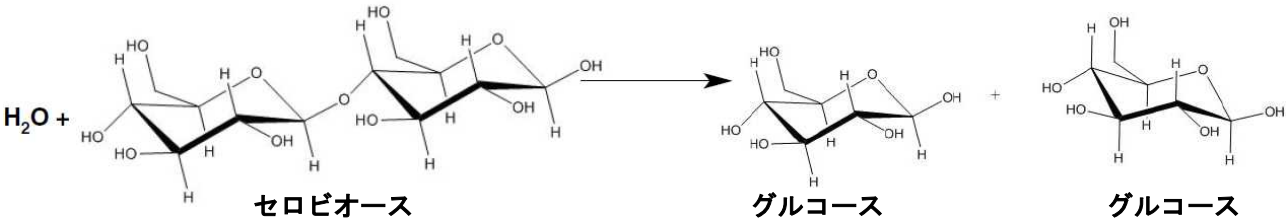


図3.　セロビオースから2分子のグルコースへの分解

セロビオースは、2 つのグルコース単位の 1 位と 4 位の炭素原子に結合します。酵素（セロビアーゼ）により結合が分解され、グルコース 2 分子が生じます。

この実験で使用する基質の検出

セロビオースはセロビアーゼの天然の基質ですが、生成物（グルコース）やセロビオースの消失を簡単に定量できる方法はありません。しかし、人工基質である p-ニトロフェニル・グルコピラノシドを使った簡単な比色分析法により、セロビアーゼの酵素活性を検出することができます。この基質である p-ニトロフェニル・グルコピラノシドは、共有結合した β グルコースとニトロフェノールから構成されています（図 4）。これら 2 分子の結合がセロビアーゼの助けにより分解されると、p-ニトロフェノールが放出されます。この酵素活性を停止させるため、また生成物を着色させるために、塩基性溶液に反応混合液を添加します。p-ニトロフェノールが塩基性溶液中におかれると、ニトロフェノール上の水酸基から H^+が塩基の OH^-に供与され、フェノール環内の結合を変化させることで、この分子が紫色の光を吸収する（かつ、黄色の光を反射する）ことになります。これにより溶液は黄色となり、既知濃度の p-ニトロフェノール溶液の黄色と目視で比較することができ、また分光光度計を使用することで、より正確な定量的な結果を得ることができます。

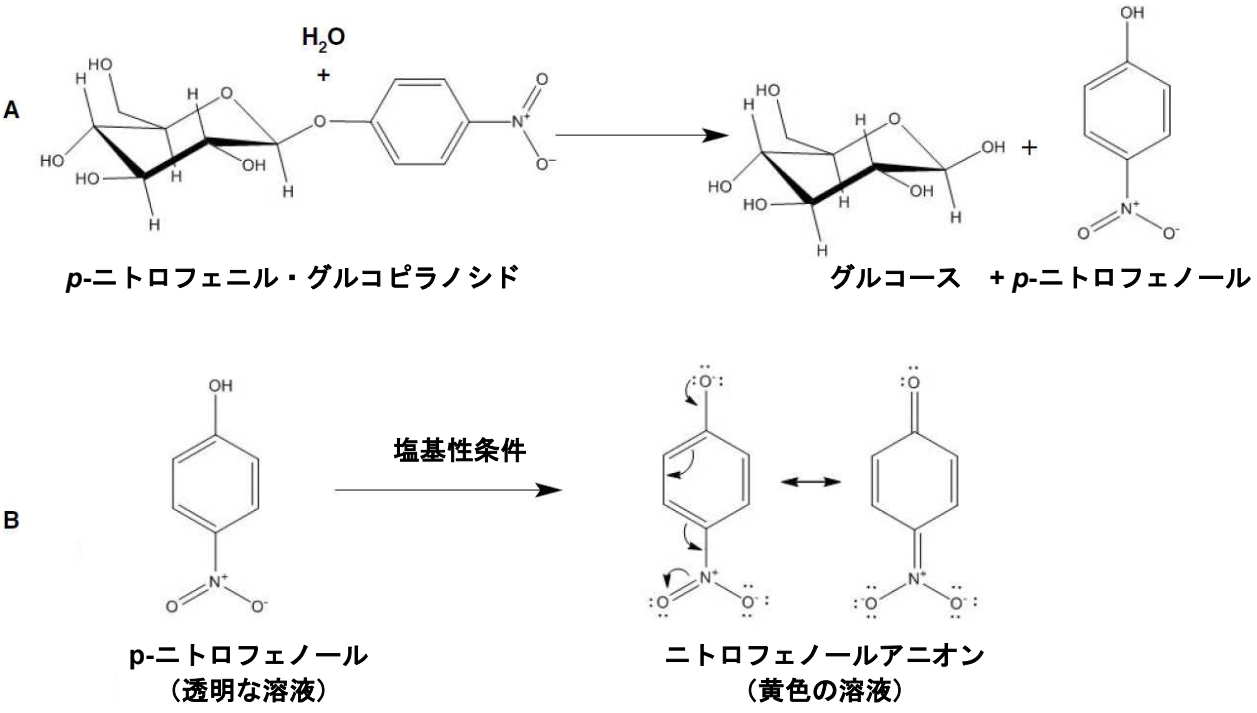


図4.　セロビアーゼ酵素によるセロビオースの分解で生じたグルコースの検出

A. p-ニトロフェニル・グルコピラノシドと呼ばれるセロビオースの類似体を用いて、酵素活性とグルコースの蓄積を検出する。セロビアーゼで切断され p-ニトロフェノールが放出されると、塩基性溶液の黄色の変色によりこれを検出することができる。

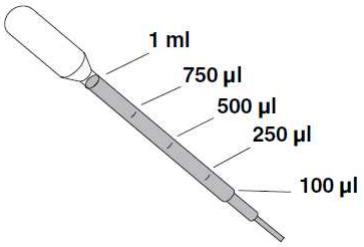
B. p-ニトロフェノールは pH5 で僅かに黄色である。しかし塩基性の条件下では、水酸基（OH^-）の水素イオンが除かれ、残った酸素基の過剰な電子対のため陰性の電荷を帯びる。この電子対はニトロフェノールアニオンに沿って移動し、黄色を呈する共鳴構造をつくる。

生徒独自の実験

このキットは、キノコサンプルからの抽出液など天然（または人工）のセロビアーゼが、本キットに含まれるモデル基質を分解する能力を調べる、ガイド付きの生徒独自の実験にも利用することができます。植物由来のセルロース分解について、極限状態でも安定性の高い天然のセルラーゼ酵素を見つけ検討するため、現在バイオ燃料産業では広範な研究が行われています。温泉や、高い（または低い）pH条件下で生存できる細菌が発見され、その酵素活性が検討されています。生徒たちは、一般的な菌類がキットで提供された基質を分解する酵素活性を調べ、キットに含まれる酵素と比較してどの程度効率的なのかを確認することができます。

容積の測定

このキットには､滅菌済みの目盛付きプラスチック製ディスポーザブルピペット(DPTP)が含まれており、100、250、500、750 および 1,000 µL を測ることができます。このイラストは、測定したい容積に相当する DPTP 上のマークを表しています。1 mL を超える容積を測る場合は、複数回測る必要があります。生徒たちが実際に実験を始める前に、DPTP を使って水を測る練習をすることをお勧めします。



乳鉢と乳棒

キノコ抽出液の反応速度上昇能の検討に実験 6 を行う場合は、乳鉢と乳棒を使ってキノコをすりつぶします。乳鉢と乳棒は十分に洗い、水で流して、抽出したセロビアーゼの働きに干渉する化学物質が残っていないようにしてください。石鹸で洗った後は水で十分にすすぎ、石鹸が残らないようにしてください。

先生に準備していただくもの

このセクションには、先生方にしていただく、各実験に必要な準備を記載しています。すべての実験で使用する基本原液を、実験の前に以下の説明を読んで調整してください。実験によって必要な容積と準備内容は異なりますので、それぞれに説明します。準備にかかる推定時間も記載しています。

実験前に準備するもの	数量
再懸濁バッファー（10倍濃度）	1ボトル
酵素	1バイアル
基質	1バイアル
反応停止液（2倍濃度）	1ボトル
標準液	1ボトル
再懸濁バッファー（1倍濃度）調製用500 mLボトル	1
反応停止液（1倍濃度）調製用200 mLボトル	1
高濃度酵素溶液調製用100 mLボトル	1
低濃度酵素溶液調製用100 mLボトル	1
3 mM基質調製用100 mLボトル	1
1.5 mM基質調製用150 mLボトル	1
標準液調製用50 mLのチューブまたはボトル	5
4～450 mLを測定できる血清用ピペッターおよびピペットまたはメスシリンダー	
プラスチック製ディスポーザブルピペット（DPTP）	2
脱イオン水または蒸留水	1,000 mL
実験用テープ（セロテープ不可）	1

試薬原液の調製

手順（推定時間－2時間）

1. **再懸濁バッファー（1倍濃度）の調製：**「再懸濁バッファー（1倍濃度）」のラベルをボトルにつけます。このボトルに再懸濁バッファー（10倍濃度）50 mLと脱イオン水または蒸留水450 mLを入れ振り混ぜます。
2. **高濃度酵素溶液の調製：**「高濃度酵素溶液」のラベルをボトルにつけます。酵素400 µLが入ったバイアルに再懸濁バッファー（1倍濃度）600 µLを加え、混ぜます。この希釈酵素液1 mLと再懸濁バッファー（1倍濃度）63 mLをボトルに入れ振り混ぜます。
3. **低濃度酵素溶液の調製：**「低濃度酵素溶液」のラベルをボトルにつけます。高濃度酵素溶液20 mLと再懸濁バッファー（1倍濃度）60 mLをボトルに入れ振り混ぜます。
4. **3 mM基質の調製：**「3 mM基質」のラベルをボトルにつけます。基質のバイアルに再懸濁バッファー（1倍濃度）1 mLを加えます。この1 mLと再懸濁バッファー（1倍濃度）98 mLをボトルに入れます。さらに再懸濁バッファー（1倍濃度）1 mLをバイアルに入れ混ぜます。この1 mLを基質溶液の入った同じボトルに入れます。粒が完全に溶けるまでよく混ぜてください。**注：**再懸濁バッファー（1倍濃度）98 mLに加えてから粉が完全に溶けるまで約10～20分かかります。
5. **1.5 mM基質の調製：**「1.5 mM基質」のラベルをボトルにつけます。3 mM基質75 mLと再懸濁バッファー（1倍濃度）75 mLをボトルに入れ、よく振り混ぜます。
6. **反応停止液（1倍濃度）の調製：**「反応停止液（1倍濃度）」のラベルをボトルにつけます。反応停止

液（2倍濃度）100 mLと脱イオン水または蒸留水100 mLをボトルに入れ、振り混ぜます。

7. **希釈標準液の調製：**
   a. 50 mLのチューブまたはボトル5本にS1～S5のラベルをつけます。
   b. 脱イオン水10 mLを各チューブに入れます。
   c. S5とラベルしたチューブに、標準液4 mLと脱イオン水または蒸留水6 mLを加え混ぜます。
   d. S4とラベルしたチューブに、S5の標準液10mLを移し、混ぜます。
   e. S3とラベルしたチューブに、S4の標準液10mLを移し、混ぜます。
   f. S2とラベルしたチューブに、S3の標準液10mLを移し、混ぜます。
   g. S2とラベルしたチューブから標準液10mLを取り除き、捨てます。
   h. 反応停止液（1倍濃度）10 mLを全5本のチューブに加え、混ぜます。

全実験の初期設定

注：1.5 mM基質、低濃度酵素溶液、反応停止液および再懸濁バッファーなどの溶液は、いくつかの実験で使用します。この全実験の初期設定で一覧にして示した溶液の容量は、6つすべての実験に必要な量です。それぞれの実験の準備に関する説明では、1回の実験に必要な最低試薬量を示しています。

また、この5段階濃度を1セットにした標準液は、1回の実験の中で生成量の定量的または定性的測定に繰り返し使用しますから、捨てないようにしてください。必要があればキュベットは実験の間パラフィルムでカバーし、4℃で保存してください。

反応時間の測定に使用したキュベット、DPTP、毎回の実験で反応に使用した15 mLコニカルチューブは、次回の実験でも生徒が繰り返し使用するものです。脱イオン水または蒸留水でよく洗い、次の実験までとっておいてください。これらのものを再利用するためには、生徒がマーカーペンで直接書き込むより、実験用テープでラベルすることをお勧めします。

実験前に準備するもの	数量
1.5 mM基質	120 mL
低濃度酵素溶液	40 mL
反応停止液（1倍濃度）	120 mL
再懸濁バッファー（1倍濃度）	64 mL
比色標準液（S1～S5）	各8 mL
15 mLコニカルチューブ	32
キュベット	40
血清用ピペッターおよびピペット	
マーカーペン	1

手順（推定時間－1時間）

1. 15 mLコニカルチューブ8本に「1.5 mM基質」のラベルをつけます。それぞれのチューブに1.5 mM基質15 mLを加えます。
2. 15 mLコニカルチューブ8本に「酵素」のラベルをつけます。それぞれのチューブに低濃度酵素溶液5 mLを加えます。
3. 15 mLコニカルチューブ8本に「反応停止液」のラベルをつけます。それぞれのチューブに反応停止液（1倍濃度）15 mLを加えます。
4. 15 mLコニカルチューブ8本に「バッファー」のラベルをつけます。それぞれのチューブに再懸濁バッファー（1倍濃度）8 mLを加えます。
5. キュベット8本にS1のラベルを付けます。それぞれのキュベットにS1標準液1 mLを加えます。
6. キュベット8本にS2のラベルを付けます。それぞれのキュベットにS2標準液1 mLを加えます。
7. キュベット8本にS3のラベルを付けます。それぞれのキュベットにS3標準液1 mLを加えます。
8. キュベット8本にS4のラベルを付けます。それぞれのキュベットにS4標準液1 mLを加えます。
9. キュベット8本にS5のラベルを付けます。それぞれのキュベットにS5標準液1 mLを加えます。

実験 1：酵素の存在下／非存在下での反応速度の決定

この実験では、酵素またはバッファー（コントロール）の存在下での、基質の分解速度を測定します。黄色の発色により生成物を検出します。

手順（推定時間－15分）

1. 生徒の実験台の準備
2. 分光光度計を使う場合は、少なくとも15分前に電源を入れてウォームアップさせてください。吸収波長を410 nmに設定します。

生徒の実験台に用意するもの	必要最低数	（✓）
1.5 mM基質	3.25 mL	❒
酵素（低濃度酵素溶液）	1.25 mL	❒
反応停止液（1倍濃度）	3.75 mL	❒
バッファー（再懸濁バッファー（1倍濃度））	0.75 mL	❒
DPTP	4	❒
15 mLコニカルチューブ	2	❒
キュベットに入った比色標準液（S1～S5）	各1本	❒
キュベット	7	❒
マーカーペン	1	❒
DPTP洗浄用の脱イオン水または蒸留水の入ったビーカー	1	❒
ストップウォッチまたはタイマー	1	❒

実験 2：反応速度に対する温度の影響の決定

この実験では、酵素の基質分解能に対する温度の影響を調べます。

手順（推定時間－30分）

1. ビーカー8個に氷を詰めます。
2. 水を37°Cに加熱します。この水をビーカー8個に実験直前に注ぎます。
3. 分光光度計を使う場合は、少なくとも15分前に電源を入れてウォームアップさせてください。吸収波長を410 nmに設定します。
4. 生徒の実験台の準備

生徒の実験台に用意するもの	必要最低数	（✓）
1.5 mM基質	1.75 mL	❒
酵素（低濃度酵素溶液）	1 mL	❒
反応停止液（1倍濃度）	1.75 mL	❒
DPTP	4	❒
キュベットに入った比色標準液（S1～S5）	各1本	❒
1.5 mLマイクロチューブ	6	❒
キュベット	3	❒
マーカーペン	1	❒
氷を入れたビーカー	1	❒
37°Cの水が入ったビーカー	1	❒
温度計	1	❒
DPTP洗浄用の脱イオン水または蒸留水の入ったビーカー	1	❒
ストップウォッチまたはタイマー	1	❒

実験 3：反応速度に対する pH の影響の決定

この実験では、酵素の基質分解能に対するpHの影響を調べます。

手順（推定時間－45分）

1. 1.5 mLマイクロチューブ8本に「3.0 mM基質」とラベルします。それぞれのチューブに3.0 mM基質1 mLを加えます。
2. 1.5 mLマイクロチューブ8本に「pH 5.0調整バッファー」とラベルします。それぞれのチューブに再懸濁バッファー（1倍濃度）250 µLを加えます。
3. 1.5 mLマイクロチューブ8本に「pH8.6調整バッファー」とラベルします。それぞれのチューブに反応停止液250 µLを加えます。
4. pH6.3調整バッファーの調製：反応停止液（1倍濃度）1.25 mLと脱イオン水または蒸留水3.75 mLをコニカルチューブに入れて混ぜます。マイクロチューブ8本に「pH 6.3調整バッファー」とラベルします。このチューブにpH6.3調整バッファー250 µLを加えます。
5. 分光光度計を使う場合は、少なくとも15分前に電源を入れてウォームアップさせてください。吸収波長を410 nmに設定します。
6. 生徒の実験台の準備

注：　この実験には、「試薬原液の調製」の指示に従って調製した高濃度基質（3.0 mM）が必要です。ほか5つの実験のいずれか1つをそれまでに実施していた場合は、実験台から1.5 mM基質をはずして、混ざらないようにしてください。

生徒の実験台に用意するもの	必要最低数	（✓）
3.0 mM基質	1 mL	❒
酵素（低濃度酵素溶液）	1 mL	❒
反応停止液（1倍濃度）	1.75 mL	❒
キュベットに入った比色標準液（S1～S5）	各1本	❒
以下が入った1.5 mLマイクロチューブ		❒
調整バッファー、pH 5.0	250 µL	❒
調整バッファー、pH 6.3	250 µL	❒
調整バッファー、pH 8.6	250 µL	❒
DPTP	4	❒
キュベット	3	❒
マーカーペン	1	❒
DPTP洗浄用の脱イオン水または蒸留水の入ったビーカー	1	❒
ストップウォッチまたはタイマー	1	❒

実験 4：反応速度に対する酵素濃度の影響の決定

この実験では、初期反応速度および最終生成量に対する酵素濃度の影響を調べます。

手順（推定時間－45分）

1. よく洗った15 mLコニカルチューブに「高濃度酵素溶液」のラベルをつけます。それぞれのチューブに高濃度酵素溶液3 mLを加えます。
2. 分光光度計を使う場合は、少なくとも15分前に電源を入れてウォームアップさせてください。吸収波長を410 nmに設定します。
3. 生徒の実験台の準備

注：　この実験には、「試薬原液の調製」の指示に従って調製した高濃度酵素溶液が必要です。ほか5つの実験のいずれか1つをそれまでに実施していた場合は、実験台から低濃度酵素溶液をはずして、混ざらないようにしてください。

生徒の実験台に用意するもの	必要最低数	（✓）
1.5 mM基質	750 µL	❒
高濃度酵素溶液	3 mL	❒
バッファー（再懸濁バッファー（1倍濃度））	1.25 mL	❒
反応停止液（1倍濃度）	3.25 mL	❒
キュベットに入った比色標準液（S1～S5）	各1本	❒
DPTP	4	❒
15 mLコニカルチューブ	1	❒
キュベット	6	❒
マーカーペン	1	❒
DPTP洗浄用の脱イオン水または蒸留水の入ったビーカー	1	❒
ストップウォッチまたはタイマー	1	❒

実験 5：反応速度に対する基質濃度の影響の決定

この実験では、初期反応速度および最終生成量に対する基質濃度の影響を調べます。この一般手順を使ってミカエリス・メンテンの分析を行い、最大反応速度（V_{max}）とミカエリス定数（K_m）を決定することもできます。詳しくは付録Aをご覧ください。

手順（推定時間－15分）

1. 生徒の実験台の準備
2. 分光光度計を使う場合は、少なくとも15分前に電源を入れてウォームアップさせてください。吸収波長を410 nmに設定します。

生徒の実験台に用意するもの	必要最低数	(✓)
1.5 mM基質	2 mL	❒
低濃度酵素溶液	1.75 mL	❒
バッファー（再懸濁バッファー（1倍濃度））	1.5 mL	❒
反応停止液（1倍濃度）	3.25 mL	❒
キュベットに入った比色標準液（S1～S5）	各1本	❒
15 mLコニカルチューブ	2	❒
DPTP	4	❒
キュベット	2	❒
マーカーペン	1	❒
DPTP洗浄用の脱イオン水または蒸留水の入ったビーカー	1	❒
ストップウォッチまたはタイマー	1	❒

実験 6：キノコ抽出液の反応速度上昇能の検討

この実験では､生徒がキノコサンプルから抽出液を調製し､この抽出液のセロビアーゼ活性の有無を調べます。

手順（推定時間－45分）

1. よく洗った15 mLコニカルチューブ8本に「抽出用バッファー」のラベルをつけます。それぞれのチューブに抽出用バッファー5 mLを加えます。
2. 分光光度計を使う場合は、少なくとも15分前に電源を入れてウォームアップさせてください。吸収波長を410 nmに設定します
3. 生徒の実験台の準備

生徒の実験台に用意するもの	必要最低数	(✓)
キノコサンプル	1 g	❒
1.5 mM基質	3.25 mL	❒
反応停止液	3.25 mL	❒
抽出用バッファー	5 mL	❒
15 mLコニカルチューブ	1	❒
1.5 mLマイクロチューブ	1	❒
DPTP	4	❒
キュベット	6	❒
乳鉢と乳棒	1	❒
マーカーペン	1	❒
DPTP洗浄用の脱イオン水または蒸留水の入ったビーカー	1	❒
ストップウォッチまたはタイマー	1	❒
ろ紙、こし布またはこし器	1	❒

典型的な授業結果

以下のデータは、22℃で行い、定量分析にSmartSpec Plusスペクトロフォトメーターを使った実験の典型的な授業結果を示しています。このキットで使用した酵素は、温度依存性が非常に高いことに注意してください。そのため、室温の変化も、ここに表示した反応速度結果に影響することがあります。室温が上昇すると反応速度も高く、早い反応時点で吸光度が飽和する可能性もあります。逆に室温が低いと反応速度も下がります。しかし、この典型的な授業結果データに見られる傾向は、実験を行った実際の温度に関わらず一定しているはずです。

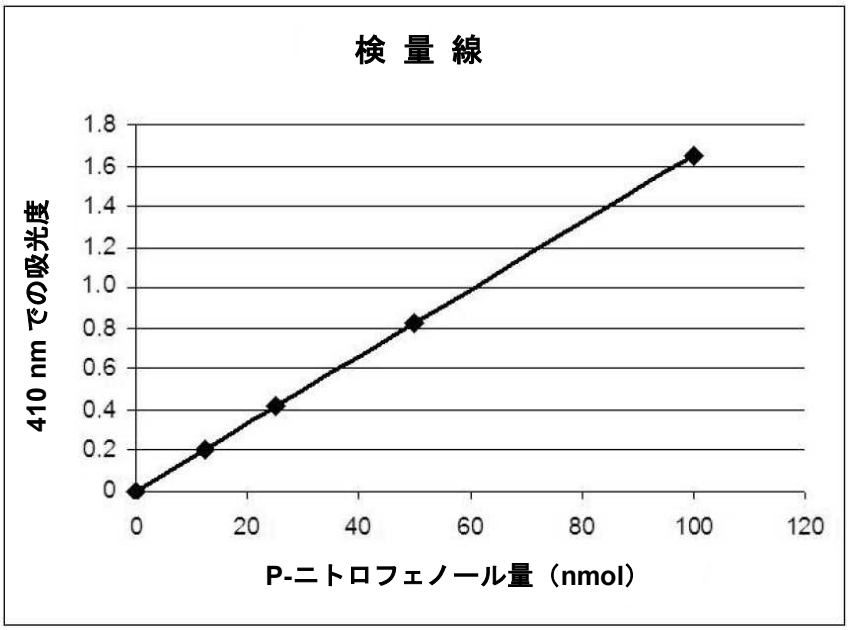
実験 1：酵素の存在下／非存在下での反応速度の決定

定性的データ

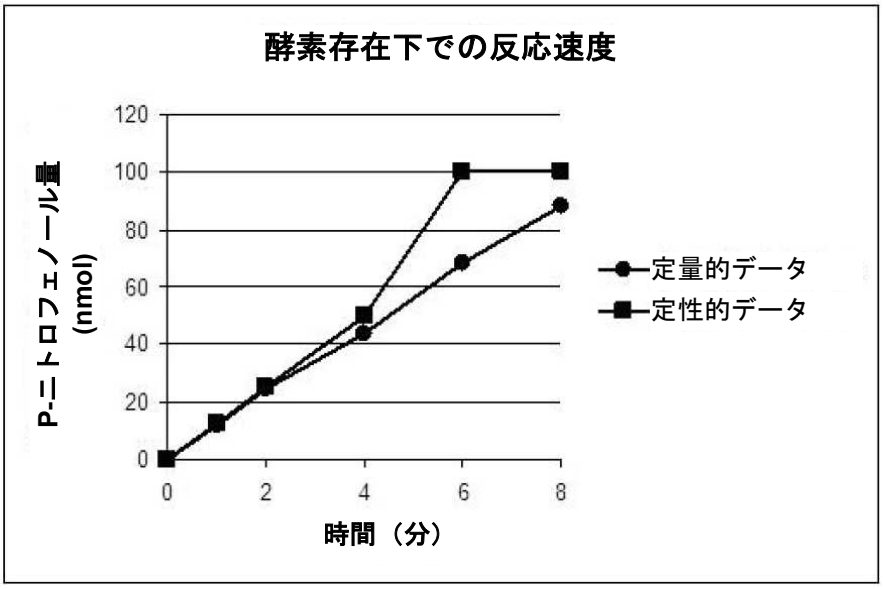
時間（分）	キュベット	最も近い標準液	P-ニトロフェノール量（nmol）
0	開始	S1	0
8	終了	S1	0
1	E1	S2	12.5
2	E2	S3	25
4	E3	S4	50
6	E4	S5	100
8	E5	S5	100

定量的データ

標準液	P-ニトロフェノール量（nmol）	410 nmでの吸光度
S1	0	0.00
S2	12.5	0.21
S3	25	0.42
S4	50	0.82
S5	100	1.65



時間（分）	キュベット	検量線から求めた P-ニトロフェノール量（nmol）	410 nmでの吸光度
0	開始	0.0	0.00
8	終了	0.0	0.00
1	E1	12.3	0.20
2	E2	24.3	0.40
4	E3	44.1	0.72
6	E4	68.4	1.12
8	E5	88.0	1.45



	定性	定量
酵素存在下での初期生成速度	12.5 nmol/分	11.2 nmol/分
酵素非存在下での生成速度	0 nmol/分	0 nmol/分

実験 2：反応速度に対する温度の影響の決定

キットに含まれる酵素では、温度が高くなると反応速度も高くなります。0°Cで実験したときは0 nmol/分に近く、温度の上昇に伴って速度も高くなるはずです。95°Cで5分以上加熱すると酵素は不活化します。

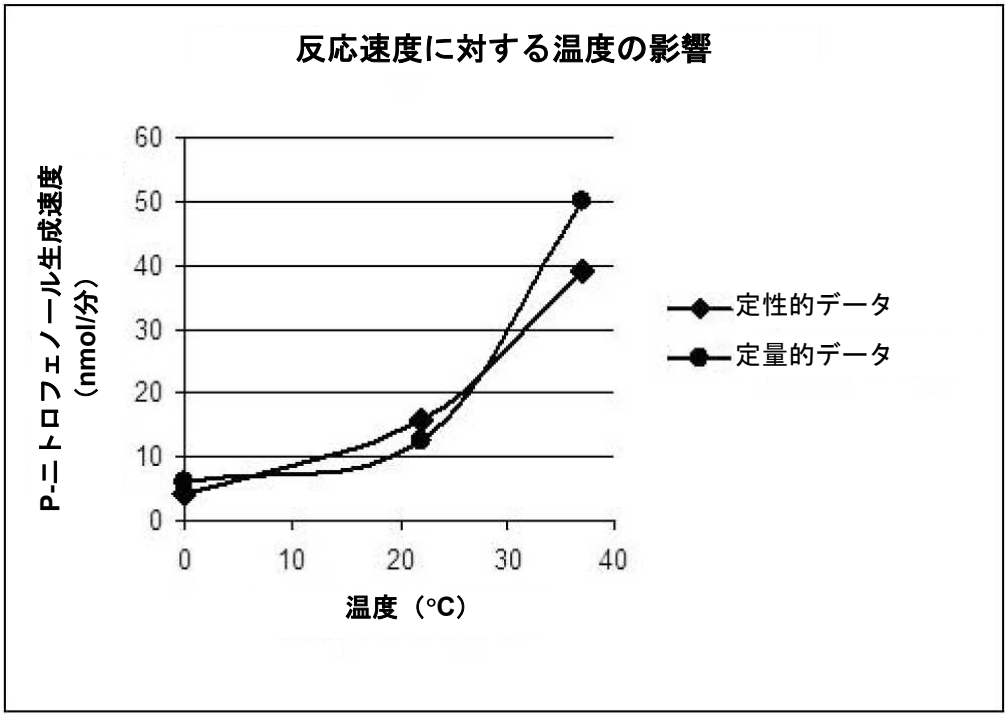
定性的結果

温度	最も近い標準液	生成P-ニトロフェノール量（nmol）
0°C	S2	12.5
約22°C（室温）	S3	25
37°C	S5	100

定量的結果

温度	410 nmでの吸光度	生成P-ニトロフェノール量（nmol）
0°C	0.13	8.1
約22°C（室温）	0.53	31.2
37°C	1.28	77.8

	定性	定量
0°Cでの初期生成速度	6.2 nmol/分	4.1 nmol/分
室温での初期生成速度	12.5 nmol/分	15.9 nmol/分
37°Cでの初期生成速度	50 nmol/分	38.9 nmol/分



実験 3：反応速度に対する pH の影響の決定

キットに含まれる酵素はpH 5で活性が最高になり、pHが高くなると不活化します。したがって、pH5で反応速度は最高となり、pHが上昇すると速度は低下するはずです。

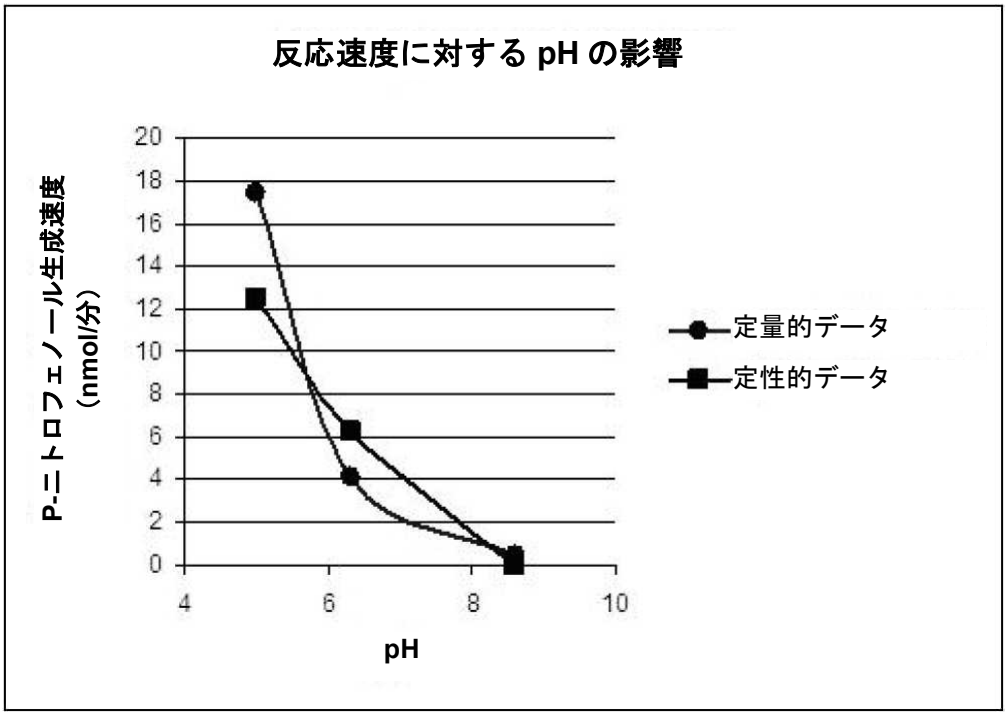
定性的結果

pH	最も近い標準液	生成P-ニトロフェノール量（nmol）
pH 5.0	S3	25
pH 6.3	S2	12.5
pH 8.6	S1	0

定量的結果

pH	410 nmでの吸光度	生成P-ニトロフェノール量（nmol）
pH 5.0	0.58	34.9
pH 6.3	0.14	8.3
pH 8.6	0.01	0.9

	定性	定量
pH5.0での初期生成速度	12.5 nmol/分	17.4 nmol/分
pH6.3での初期生成速度	6.2 nmol/分	4.1 nmol/分
pH8.6での初期生成速度	0 nmol/分	0.4 nmol/分



実験 4：反応速度に対する酵素濃度の影響の決定

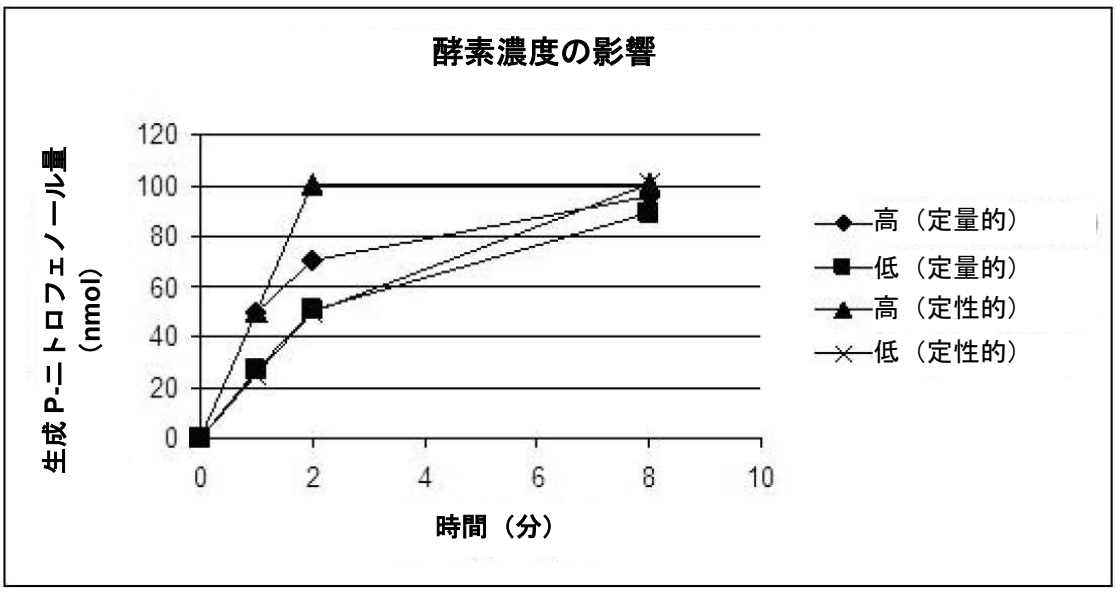
酵素濃度が高いと初期反応速度も高くなります。十分に長い反応時間をとれば、高濃度酵素溶液と低濃度酵素溶液の反応に用いられる基質量は同じですから、両反応の最終生成量も同等になります。この実験で使用する基質量は少量なので、実験の時間枠内ではすべてが生成物に変換されることになります。

定性的結果

キュベット	最も近い標準液	生成P-ニトロフェノール量（nmol）
H1	S4	50
H2	S5	100
H3	S5	100
L1	S3	25
L2	S4	50
L3	S5	100

定量的結果

キュベット	410 nmでの吸光度	生成P-ニトロフェノール量（nmol）
H1	0.82	49.7
H2	1.16	70.3
H3	1.58	95.8
L1	0.44	26.7
L2	0.84	50.9
L3	1.47	89.1



	定性	定量
高酵素濃度での初期反応速度	50 nmol/分	49.7 nmol/分
低酵素濃度での初期反応速度	25 nmol/分	26.7 nmol/分

実験 5：反応速度に対する基質濃度の影響の決定

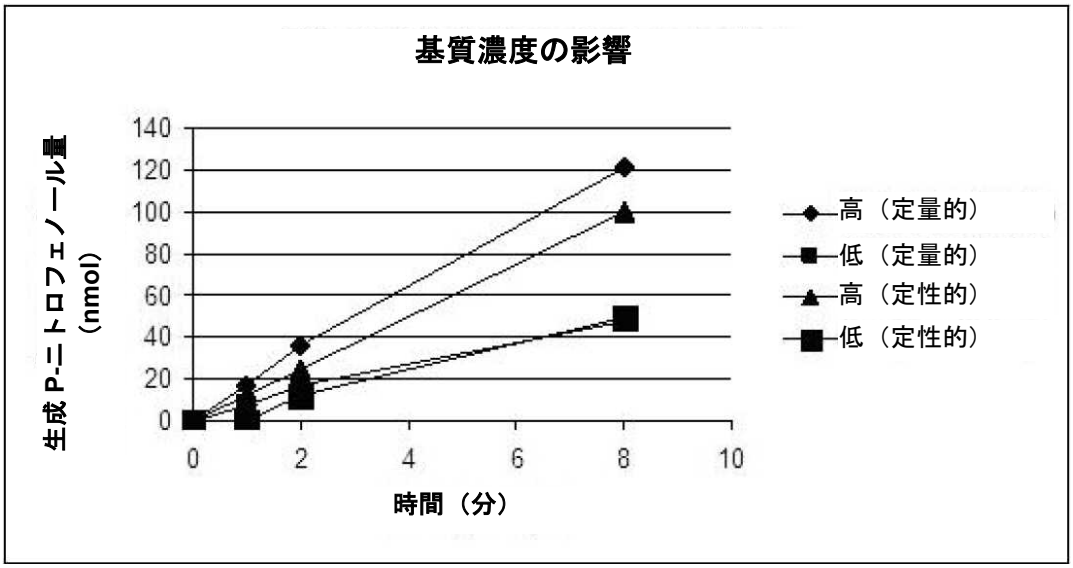
存在する酵素が基質によって完全に飽和しないとすると、基質濃度が高くなると初期反応速度も高くなります。高基質濃度反応では酵素の飽和状態に近く、一方で低基質濃度反応では酵素を完全には飽和しないように、この実験での高濃度／低濃度の基質反応を設計しています。反応がかなり長時間進んでも、その最終生成量は高基質濃度反応の方が低基質濃度反応より多くなります。

定性的結果

キュベット	最も近い標準液	生成P-ニトロフェノール量（nmol）
H1	S2	12.5
H2	S3	25
H3	S5	100
L1	S1	0
L2	S2	12.5
L3	S4	50

定量的結果

キュベット	410 nmでの吸光度	生成P-ニトロフェノール量（nmol）
H1	0.28	16.9
H2	0.59	35.8
H3	2.00	121
L1	0.12	7.3
L2	0.28	16.9
L3	0.79	47.9



	定性	定量
高基質濃度での初期反応速度	12.5 nmol/分	16.9 nmol/分
低基質濃度での初期反応速度	0 nmol/分	7.3 nmol/分

実験 6：キノコ抽出液の反応速度上昇能の検討

結果は様々となる。

有益情報とよくあるご質問

1. 学校に分光光度計はありますが、4 mLのサンプルが必要です。この分光光度計を使うことはできますか？

このキットに含まれる試薬と標準液の吸光度範囲は約0.2～1.7です。したがって定量的アッセイだけをしたい場合は、基質と酵素の容積を2倍にし、最終溶液を脱イオン水または蒸留水で1：1に希釈した実験をすることが可能です。つまり、すべてのサンプルは4 mLになり、かつ0.1～0.85の吸光度範囲になります。2倍の容積の溶液を使用するとき、8つの実験台で全6回の実験を行う十分な溶液量ではないことに注意してください。またこのキットに含まれるキュベットではなく、その分光光度計用の4 mLサンプルチューブも必要です。キュベットには約2 mLしか入りません。

2. 学校の分光光度計は1以上の吸光度では線形になりません。どうしたらいいでしょうか？

以下の解決法は、実験が定量的データのみを使って行われることを想定しています。
反応が完了し反応停止液を加えた後、各キュベットに脱イオン水または蒸留水1 mLを加えることができます。溶液を混ぜて410 nmでの吸光度を読んでください。この操作により、410 nmでの吸光度は1.0を下回るはずです。

3. サンプルを読むのに410 nm以外の波長は使うことができますか？

p-ニトロフェノールのピーク吸光度は400–410 nmです。高波長ではシグナル強度が低下します。高波長で読むことはできますが、低濃度範囲のp-ニトロフェノールの感度が低下することになります。

4. 希釈した酵素、標準液、基質およびバッファーを数週間保存することはできますか？

4°Cで保存された希釈酵素は1週間安定し、標準液と再構成した基質溶液は1ヵ月間、バッファーは長期間（目安3年間）安定しています。

5. 反応停止液をこぼしてしまいましたが、今日実験する必要があります。どうしたらよいでしょうか？

pH 9.5以上の水酸化ナトリウム溶液を反応停止液として使用することはできます。

6. 37°C以上、またはほかのpH値で実験することはできますか？

はずれた温度やpH値のデータがほしい場合、このような実験を行うことはできますが、8つの実験台で全6回の実験を行う十分な試薬は含まれていません。また、このキットに含まれる酵素は高温で活性が上昇します。高温では分光光度計の線形範囲を超えた吸光度になる可能性もあります。その場合はサンプルを脱イオン水または蒸留水で希釈してから、分光光度計で読んでください。高温で反応を進める場合は、（このキットには含まれませんが）安全のためスクリューキャップチューブを使用してください。

7. 温度は何度になると酵素が不活化しますか？

95°Cで5分間以上加熱すると酵素が不活化します。

8. ひととおりのミカエリス・メンテン試験をしたいと思っています。このキットを使ってのやり方はありますか？

実験5の手順を使用することができます。詳しくは付録Aをご覧ください。「先生に準備していただくもの」で調製した3 mM基質と1.5 mM基質を希釈し、様々な基質濃度にすることができます。これら様々な出発基質濃度について初期反応速度を測定し、これを使ってLineweaver-Burkプロットを作成できます。ひととおりのミカエリス・メンテン分析を行う場合、8つの実験台で全6回の実験を行えるだけの

十分な試薬量は含まれていません。

9. この実験に野生のキノコを勧めないのはなぜですか？

野生のキノコは毒を持つ可能性があるため、スーパーで購入したものを使用することを勧めています。次のようなキノコがこのキットに適していることが分かっています：ホワイトボタン（白いマッシュルーム）、クリミニキノコ（茶色いマッシュルーム)、シイタケ、干しシイタケ、エノキ、オイスターキノコ（ヒラタケ)。

10. そのほか、サプリメントなどのセロビアーゼはこの実験に使えますか？

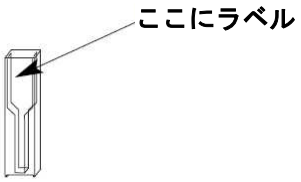
サプリメントのセロビアーゼはこれまで検討されていませんが、β-グルコシダーゼ活性をもつのであれば使えるはずです。

クイックガイド

実験 1：酵素の存在下／非存在下での反応速度の決定

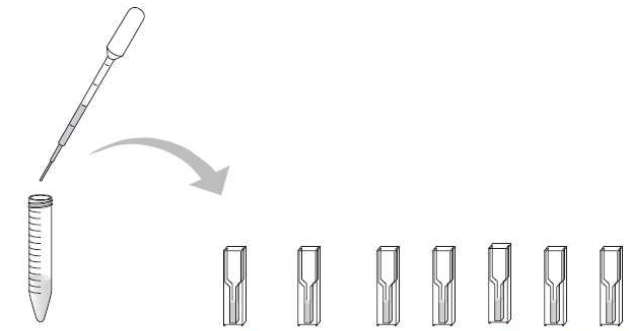
1. 「反応停止液」、「1.5 mM基質」、「酵素」、「バッファー」とラベルされた15 mLコニカルチューブを置きます。それぞれのチューブに自分のイニシャルを記入しておきます。

2. 5本のキュベットにE1～E5のラベルを付けます。



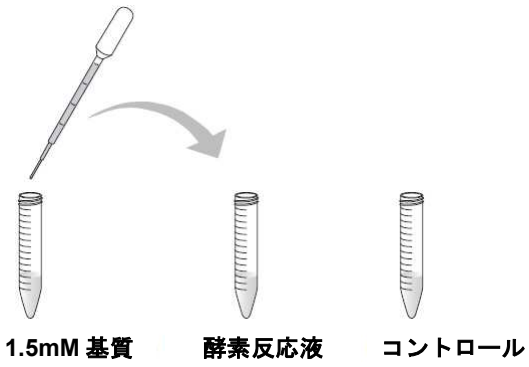
3. 残りの2本のキュベットに「開始」と「終了」のラベルをつけます。

4. 新しいDPTPを使って、ラベルを付けたそれぞれのキュベットに反応停止液500 µLを移します。このDPTPは水でよく洗い流します。



5. 空の15 mLコニカルチューブ1本に「酵素反応液」、もう1本に「コントロール」とラベルをつけます。

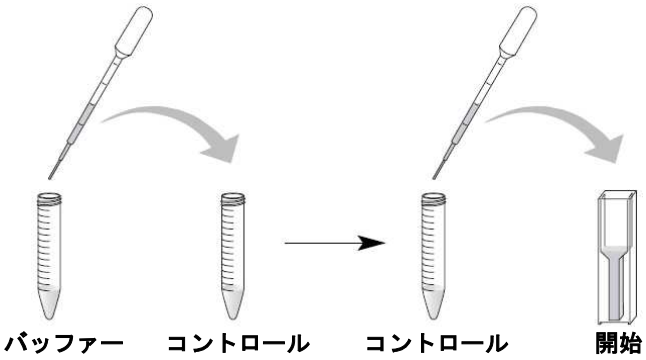
6. 新しいDPTPを使って、1.5 mM基質2 mLを「酵素反応液」とラベルした15 mLコニカルチューブに移します。同じDPTPを使って、1.5 mM基質1 mLを「コントロール」とラベルしたコニカルチューブに移します。このDPTPは水でよく洗い流します。



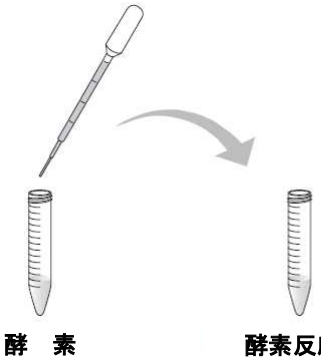
7. 1本のDPTPは酵素（Enzyme）の「E」、もう1本はコントロール（Control）の「C」とラベルします。酵素反応チューブには「E」とラベルしたDPTPのみを、コントロール反応チューブには「C」とラベルしたついたDPTPのみを使用します。

8〜11の手順は実験を進める前によく読んで理解しておいてください。これらの手順にはタイムリミットがあります！

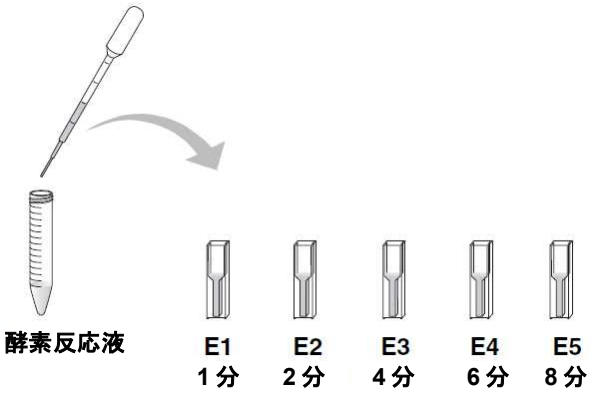
8. 「C」とラベルしたDPTPを使って、バッファー500 µLを「コントロール」とラベルした15 mLコニカルチューブに移し、穏やかに混ぜます。基質とバッファーを混ぜたのち、この溶液500 µLを取り出して「開始」とラベルしたキュベットに加えます。



9. 「E」とラベルしたDPTPを使って、酵素1 mLを「酵素反応液」とラベルした15 mLコニカルチューブに移します。穏やかに混ぜ、タイマーをスタートさせます。

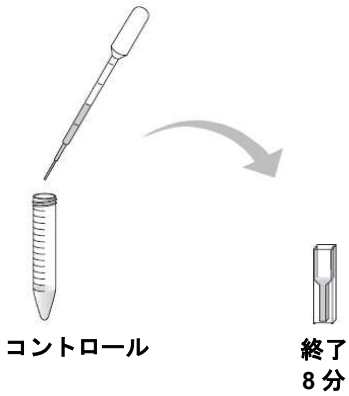


10. 下表に示す時点で、「E」とラベルしたDPTPを使って「酵素反応液」チューブから溶液500 µLを取り出し、反応停止液の入っている、経過時間に合った適切なラベルのついたキュベットに加えます。



11. すべての経過時間での酵素反応液の添加後、「C」とラベルしたDPTPを使って「コントロール」反応チューブから500 µLを取り出し、「終了」とラベルしたキュベットに加えます。

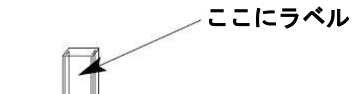
12. 自分たちのサンプルの分析に進みます。分析が終了した後、反応コニカルチューブ、キュベットおよびDPTPを大量の水で洗い流し、後の実験にとっておきます。



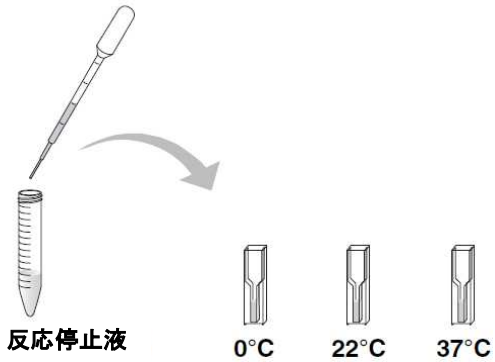
注：未使用の原液は捨てないでください。次の実験にも使用します。

実験 2：反応速度に対する温度の影響の決定

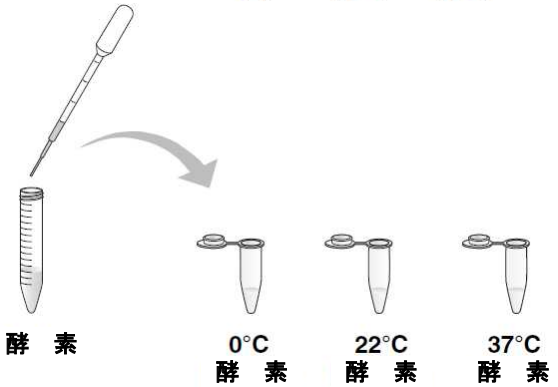
1. キュベットに「0°C」、「22°C」、「37°C」とラベルをつけます。



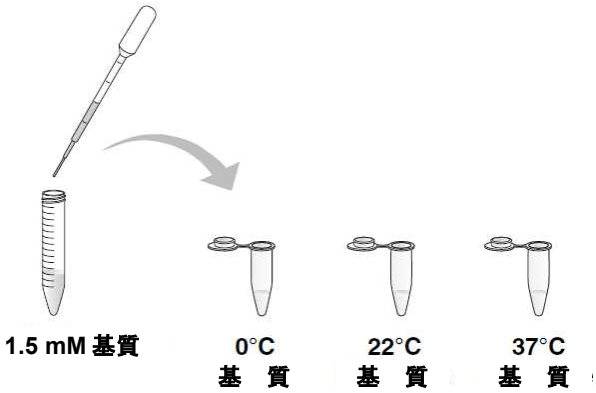
2. 新しいDPTPを使って反応停止液500 µLをそれぞれのキュベットに移します。このDPTPは水で十分に洗います。



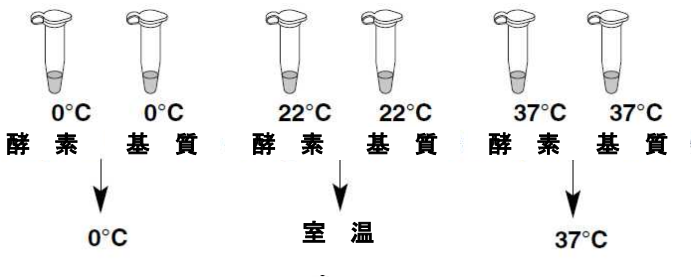
3. 1.5 mLマイクロチューブ3本に「0°C酵素」、「22°C酵素」、「37°C酵素」とラベルをつけます。新しいDPTPを使って、酵素250 µLをそれぞれのマイクロチューブに移します。このDPTPは水で十分に洗い流します。



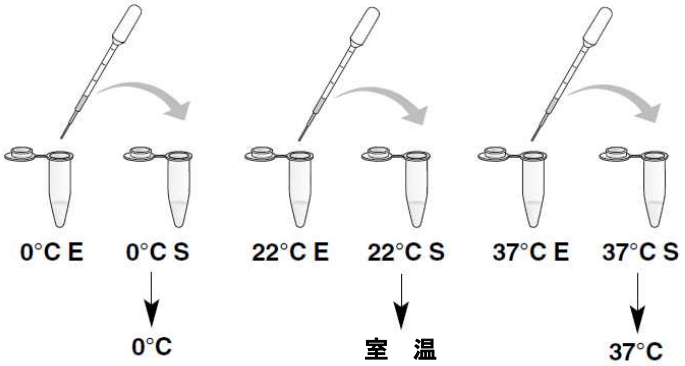
4. 1.5 mLマイクロチューブ3本に「0°C基質」、「22°C基質」、「37°C基質」とラベルをつけます。新しいDPTPを使って、1.5 mM基質500 µLをそれぞれのマイクロチューブに移します。このDPTPは水で十分に洗い流します。



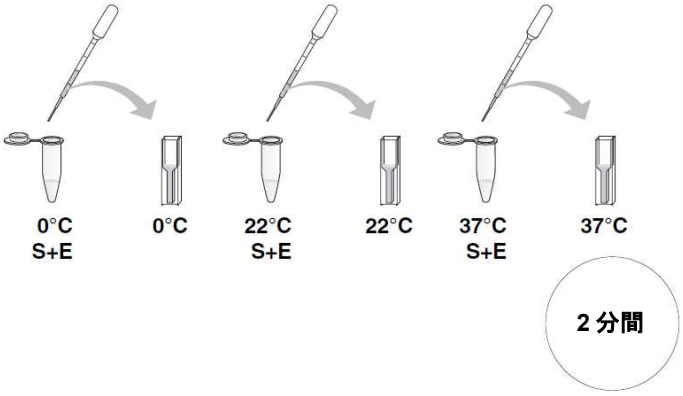
5. 「0°C酵素」、「0°C基質」とラベルしたチューブを氷の入った容器に入れます。「22°C酵素」、「22°C基質」とラベルしたチューブは実験台の上におきます。「37°C酵素」、「37°C基質」とラベルしたチューブを、37°Cのぬるま湯を入れたビーカー内におきます。それぞれの温度に5分以上おいて平衡化させます。



6. ストップウォッチを用意します。新しいDPTPを使って、「0°C酵素」とラベルしたチューブから、酵素250 µLを「0°C基質」とラベルしたチューブに移し、この酵素と基質の入ったチューブを氷の上に戻します。22°Cの酵素を22°Cの基質溶液に加え、このチューブを実験台の上に戻します。37°Cの基質を37°Cの酵素溶液に加え、37°Cのウォーターバスに戻します。**タイマーをスタートさせます。**



7. 2分後、それぞれの温度反応に新しいDPTPを使って、反応液500 µLを、反応停止液の入った該当するラベルのついたキュベットに移します。



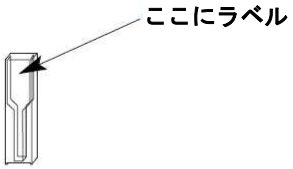
8. 自分たちのサンプルの分析に進みます。分析が終了した後、キュベットおよびDPTPを大量の水で洗い流し、後の実験にとっておきます。

注：未使用の原液は捨てないでください。次の実験にも使用します。

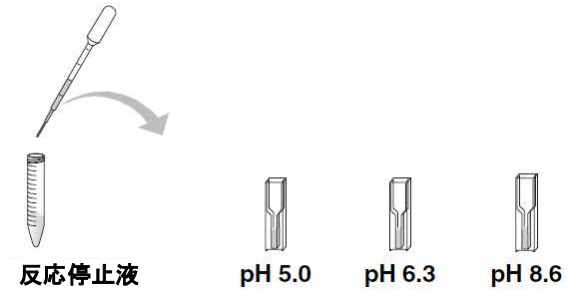
クイックガイド

実験 3：反応速度に対する pH の影響の決定

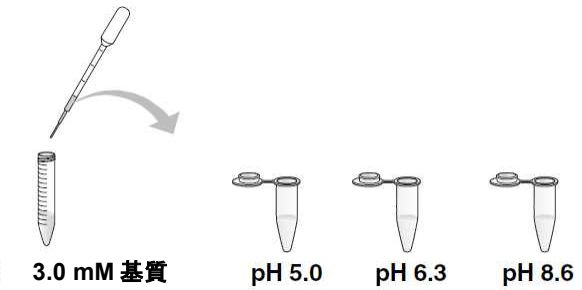
1. キュベットに「pH 5.0」、「pH 6.3」、「pH 8.6」のラベルをつけます。



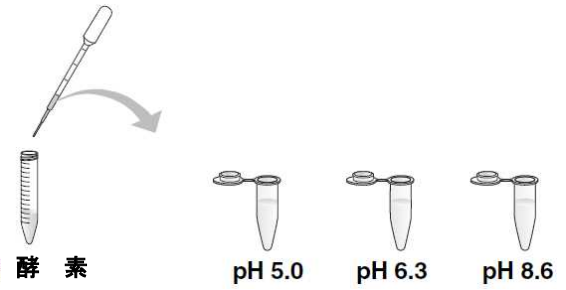
2. 新しいDPTPを使って反応停止液500 µLをそれぞれのキュベットに移します。このDPTPは水で十分に洗います。



3. 新しいDPTPを使って、3.0 mM基質250 µLを、先生が「pH 5.0」、「pH 6.3」、「pH 8.6」とラベルしておいたそれぞれのマイクロチューブに移します。このDPTPは水で十分に洗います。

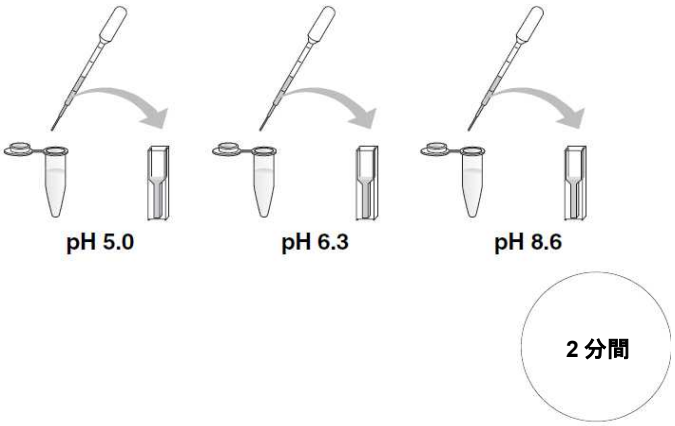


4. ストップウォッチを用意します。新しいDPTPを使って、酵素250 µLを、ラベルのついた各マイクロチューブに加えます。**タイマーをスタートさせます。**



5. 2分後、それぞれのpH反応ごとに新しいDPTPを使って、反応液500 µLを、反応停止液の入った該当のラベルのついたキュベットに移します。

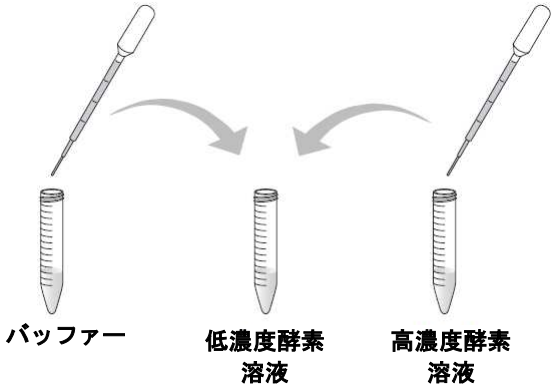
6. 自分たちのサンプルの分析に進みます。分析が終了した後、キュベットおよびDPTPを大量の水で洗い流し、後の実験にとっておきます。



注：未使用の原液は捨てないでください。次の実験にも使用します。

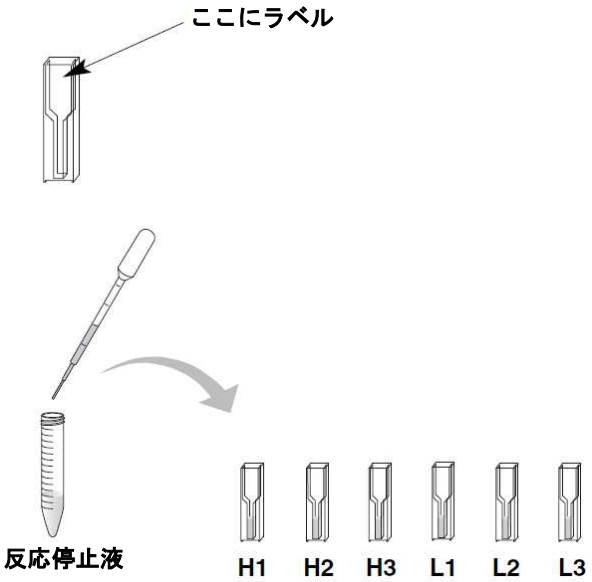
実験 4：反応速度に対する酵素濃度の影響の決定

1. 15 mLコニカルチューブ1本に「低濃度酵素溶液」のラベルをつけます。新しいDPTPを使ってバッファー1 mLをチューブに移します。このDPTPを水で洗います。高濃度酵素溶液1 mLを「低濃度酵素溶液」のラベルのついたチューブに移し、混ぜます。このDPTPは水で十分に洗います。



2. キュベット3本に「H1～H3」（高酵素濃度の各時点）とラベルをつけ、残りのキュベット3本に「L1～L3」（低酵素濃度の各時点）のラベルをつけます。ラベルはキュベット前面の上部にのみつけます。

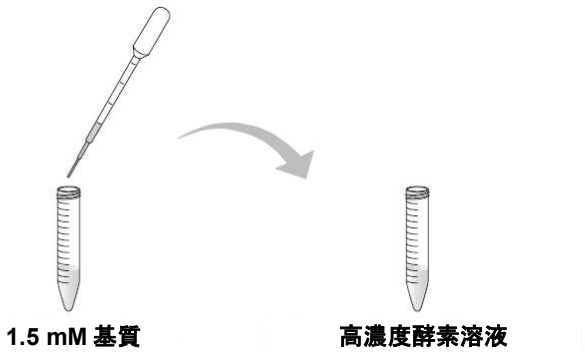
3. 新しいDPTPを使って反応停止液500 µLをそれぞれのキュベットに移します。このDPTPは水で十分に洗います。



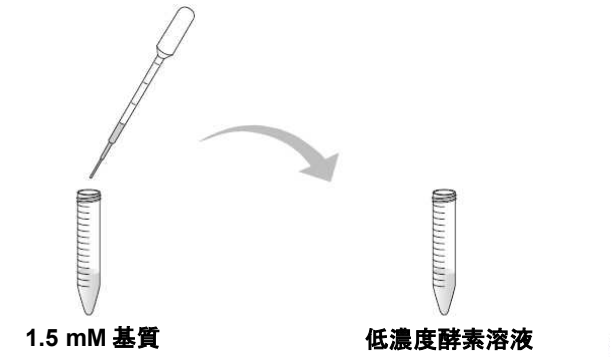
4. 新しいDPTP1本に高い酵素濃度を表す「H」とラベルし、別のDPTP1本に低い酵素濃度を表す「L」とラベルします。

5〜7のステップは実験を進める前によく読んでおいてください。これらの手順にはタイムリミットがあります!

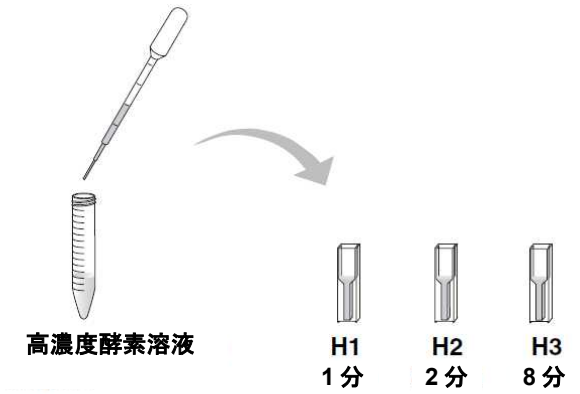
5. 「H」とラベルのついたDPTPを使い、1.5 mM基質250 µLを「高濃度酵素溶液」とラベルした酵素を含む15 mLコニカルチューブに移します。



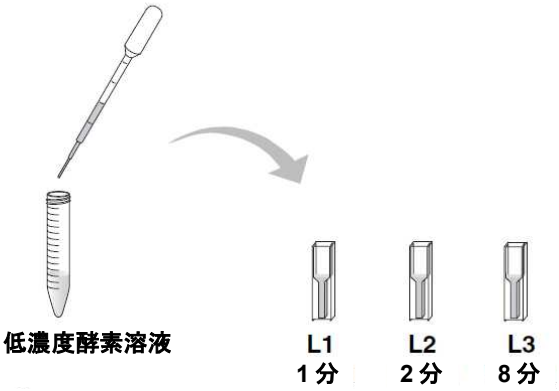
6. 「L」とラベルのついたDPTPを使い、1.5 mM基質250 µLを「低濃度酵素溶液」とラベルした酵素を含む15 mLコニカルチューブに移します。**タイマーをスタートさせます。**



7. 下表に示す時点で、正しくラベルしたDPTPを使って「高濃度酵素溶液」および「低濃度酵素溶液」とラベルした15 mLコニカルチューブから溶液500 µLを取り出し、反応停止液の入っている該当のラベルのついたキュベットに加えます。



8. 自分たちのサンプルの分析に進みます。分析が終了した後、チューブ、キュベットおよびDPTPを大量の水で洗い流し、後の実験にとっておきます。

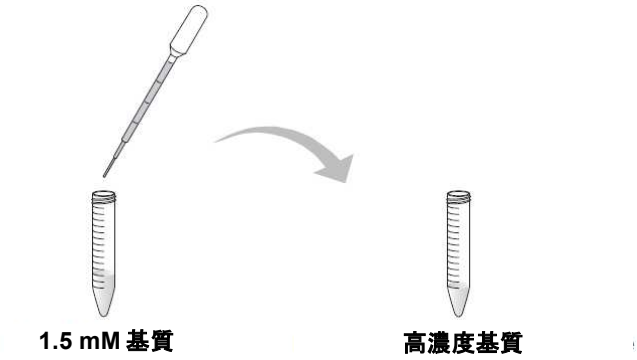


注：未使用の原液は捨てないでください。次の実験にも使用します。

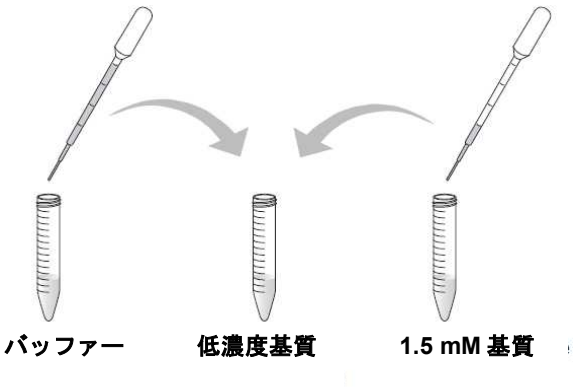
実験 5：反応速度に対する基質濃度の影響の決定

1. よく洗った15 mLコニカルチューブ1本に「低濃度基質」とラベルし、別の15 mLコニカルチューブ1本に「高濃度基質」とラベルします。

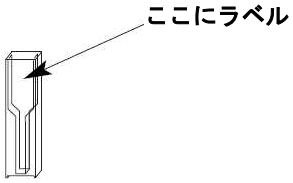
2. 新しいDPTPを使って、1.5 mM基質1.5 mLを「高濃度基質」とラベルした15 mLコニカルチューブに移します。このDPTPをきれいな水で十分に洗い流します。



3. 新しいDPTPを使って、バッファー1.25 mLを「低濃度基質」とラベルした15 mLコニカルチューブに移します。このDPTPを水で十分に洗い流し、1.5 mM基質250 µLを「低濃度基質」とラベルした15 mLコニカルチューブに移し、混ぜます。このDPTPを水で十分に洗い流します。

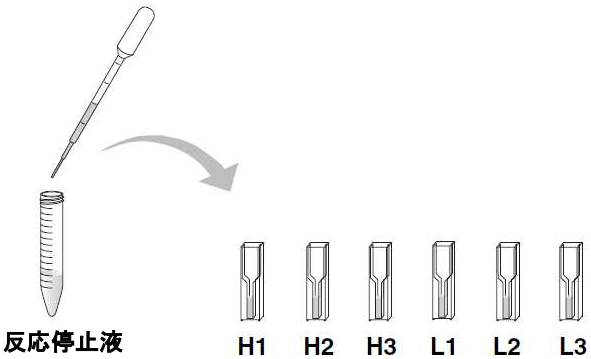


4. キュベットに「H1～H3」（高基質濃度の各時点）と「L1～L3」（低基質濃度の各時点）のラベルをつけます。ラベルはキュベット前面の上部にのみつけます。



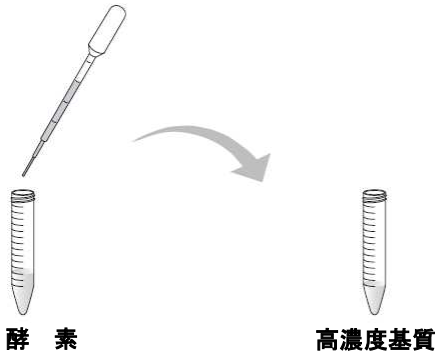
5. 新しいDPTPを使って反応停止液500 µLをそれぞれのキュベットに移します。このDPTPを水で十分に洗い流します。

6. DPTP1本に高基質濃度を表す「H」とラベルし、別の1本に低基質濃度を表す「L」とラベルします。

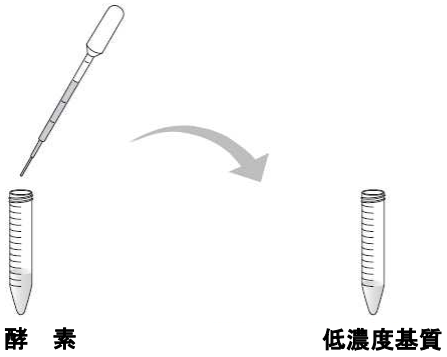


7〜9のステップは実験を進める前によく読んで、理解しておいてください。これらの手順にはタイムリミットがあります!

7. 新しいDPTPを使って、酵素750 µLを「高濃度基質」とラベルした15 mLコニカルチューブに移します。

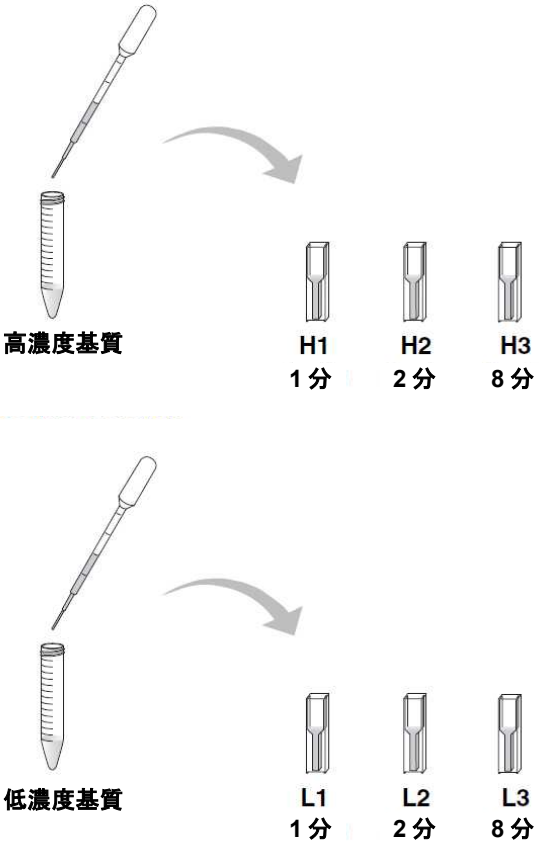


8. 新しいDPTPを使って、酵素750 µLを「低濃度基質」とラベルした15 mLコニカルチューブに移します。**タイマーをスタートさせます。**



9. 下表に示す時点で、正しくラベルしたDPTPを使って「高濃度基質」および「低濃度基質」とラベルした15 mL遠心反応チューブから溶液500 µLを取り出し、反応停止液の入っている該当のラベルのついたキュベットに加えます。

10. 自分たちのサンプルの分析に進みます。分析が終了した後、反応チューブ、キュベットおよびDPTPを大量の水で洗い流し、後の実験にとっておきます。



注：未使用の原液は捨てないでください。次の実験にも使用します。

実験 6：キノコ抽出液の反応速度上昇能の検討

1. 使うキノコの名称を書きます。

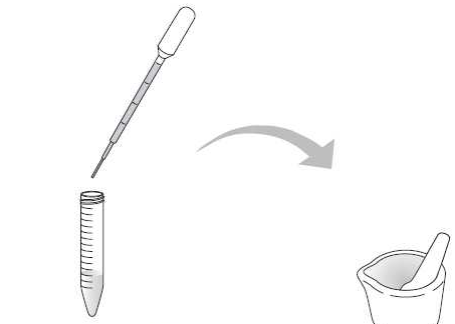
   _____

2. キノコ約1グラムを量り、乳鉢に入れます。

3. キノコ1グラムあたり抽出用バッファー2 mLを乳鉢に加えます。必要な抽出用バッファーの量を計算するためには、キノコの重量（グラム単位）に2をかけ、mLの単位をつけます。

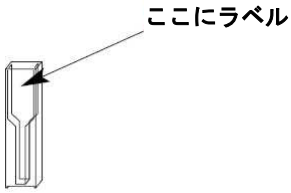
   キノコの重量 ____ g × 2 = _____ mL

4. 乳棒を使ってキノコをすり、懸濁液状にします。



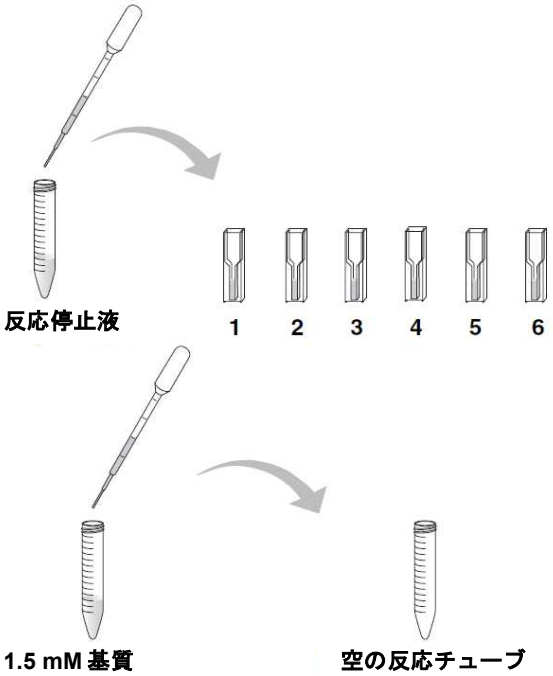
5. ろ紙またはこし布を使ってこの懸濁液の固体粒子をこして、ろ液を1.5 mLマイクロチューブに入れます。もしくは遠心した場合は、懸濁液を1.5 mLマイクロチューブにすくい入れ、最高速度で2分間遠心して固体粒子を沈殿させます。
   注：酵素反応を行うためには250 µL以上の抽出液が必要です。

6. キュベットに「1～6」のラベルをつけます。ラベルはキュベット前面の上部にのみつけます。



7. 新しいDPTPを使って反応停止液500 µLをそれぞれのキュベットに移します。このDPTPは水で十分に洗い流します。

8. 15 mLコニカルチューブ1本に使うキノコの種類を書いたラベルを貼り、新しいDPTPを使って基質3 mLをこのチューブに移します。



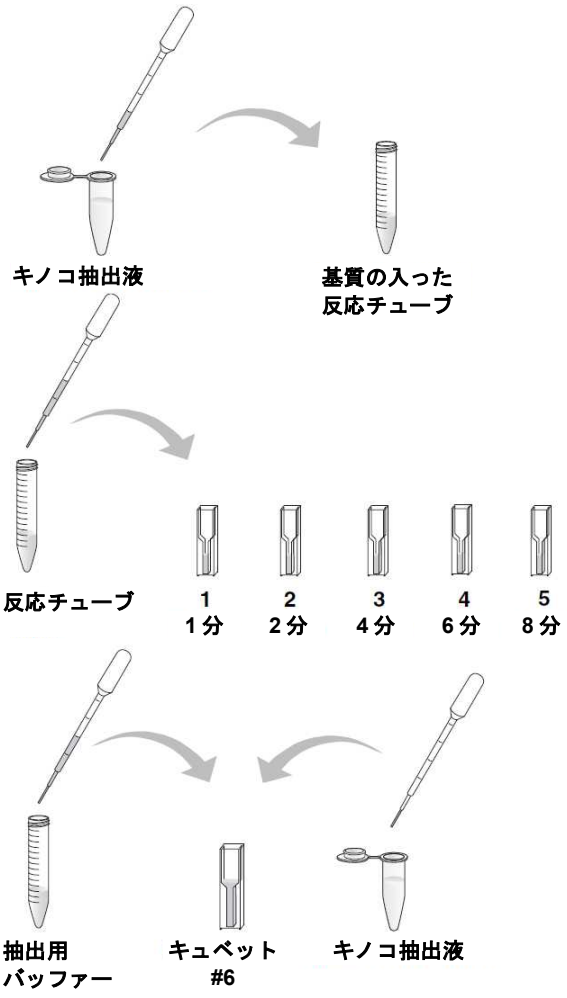
9〜10のステップは実験を進める前によく読んで、理解しておいてください。これらの手順にはタイムリミットがあります!

9. 新しいDPTPを使って、酵素抽出液250 µLを基質の入った15 mLコニカルチューブに移します。**タイマーをスタートさせます。**

10. 下表に示す時点で、反応チューブからキノコ抽出液と基質の混液500 µLを取り出し、反応停止液の入っている該当のラベルのついたキュベットに加えます。

11. 新しいDPTPを使って抽出用バッファー500 µLをキュベット#6に移します。このDPTPを洗い、さらにキノコ抽出液1滴を加えます。この溶液が今回の実験の「ブランク」となります。

12. 自分たちのサンプルの分析に進みます。分析が終了した後、反応チューブ、キュベットおよびDPTPを大量の水で洗い流し、後の実験にとっておきます。



注：未使用の原液は捨てないでください。次の実験にも使用します。

生徒用テキスト

背　景

酵素とは

酵素とは、（これがなければ反応速度は著しく遅くなるような）化学反応の触媒として働く物質で、通常はタンパク質ですが一部は核酸として認められます。細胞内で生じる化学反応の大半を加速しています。分子を分解する反応（消化や細胞性呼吸に関わる）や、分子を構築する反応（光合成やDNA複製）などのすべてに酵素が必要です。それぞれの種類の酵素は独自の形状をもち、その基質の構造と合わせたものになっています（図5）。基質とは、酵素により生成物に変換される分子または分子群のことです。基質は、活性部位と呼ばれる球状タンパク質のくぼみにぴったりと入ります。この活性部位の形状と化学的性質が、酵素機能に重要な役割を果たします。

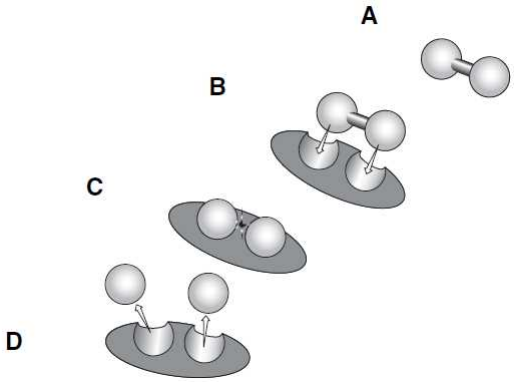


図5.　溶液中のセロビオースとセロビアーゼ

A. 溶液中のセロビオースは、2 つのグルコース分子が β 1–4 結合により共有結合している。 B. セロビアーゼには、セロビオース分子がぴったりとおさまるポケットが存在する。 C. セロビアーゼは、セロビオースの 2 つのグルコース分子間結合が分解されやすいよう、セロビオースの形状を安定化させる。 D. セロビオースの β 1–4 結合が切断されると、2 つのグルコース分子がセロビアーゼから放出され、この酵素には別のセロビオース分子が自由に結合できるようになり、このサイクルが再び開始される。

酵素が加速する多くの化学反応は、その酵素がなければ速度が大きく落ちます。酵素は基質の位置を決め、その結合が不安定で反応性になるように調節することで反応を加速します。これを「お見合い」にたとえてみましょう。2人だけでも互いを見つけ、接触することはできるかもしれません。しかし仲人がいれば、2人を同時間に同じ部屋に集めることで、この過程を加速することができます。仲人は互いの良い点を指摘して、カップルに影響を与えることもあるでしょう。酵素と同様、仲人自身は変わることなく、この縁を進めることができます。化学的な言葉でいえば、酵素は反応の活性化エネルギーを低下させます。これは反応を進ませるのに必要なエネルギー量のことです。酵素は反応の遷移状態も安定化させます。遷移状態とは、反応中に最高エネルギーをもつ構造のことです。このエネルギーを低下させることで、反応は非常に簡単に進むことができます。

酵素はそれが働く条件について「好みがうるさい」といえます。温度とpHは、その酵素が反応を効率的に触媒するために理想的なものでなければなりません。すべての化学反応について、温度の上昇によって分子の運動性が高まり、衝突回数が増えます。分子の平均運動エネルギーを上昇させ、反応できる回数を増やすようにします。しかし酵素反応では、あまりに高温であることは悪く作用します。皆さんは以前にタンパク質を勉強したとき、タンパク質内の非共有結合（水素結合、イオン結合など）は高温で分解されると習ったと思います。これによって酵素の形状が変わってしまいます。酵素の形状が変わると、その活性部位が基質に適合しなくなり、酵素は機能できなくなります。

セロビアーゼ（酵素）

今回の実験ではセロビアーゼを勉強します。セロビアーゼは、セルロース（植物の細胞壁に認める長いグルコース鎖の束で構成される分子）をグルコースに分解するプロセスの、最終段階に関わっています。これは多くの菌類や細菌（シロアリの腸、反芻動物の胃、堆肥の山などに存在する）が利用している天然のプロセスで、それらの食料源としてグルコースを産生します。植物セルロースの糖への分解は、燃料用にエタノールを生成する重要段階でもあります。

セロビアーゼの基質

セロビアーゼの天然の基質はセロビオースです(図6)。これは2つのβグルコース分子から成る二糖類です。しかし科学者が酵素機能を研究する際は、使い尽くされた基質量や、産生された生成量を決定する簡単な方法を考えるのが一番です。セロビオース（基質）とグルコース（生成物）の溶液は透明で、このような分子を定量的に評価する、簡単で安価で迅速な方法はあまり存在しません。

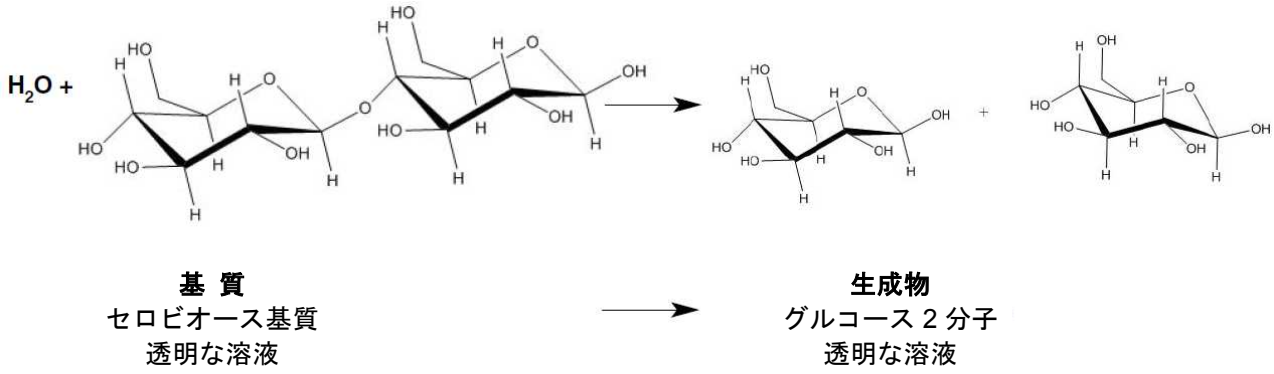


図6. セロビアーゼによるセロビオースの分解

セロビアーゼの天然の基質は二糖類セロビオースである。セロビオースにセロビアーゼが結合すると、セロビアーゼが 2 つのグルコース分子をつないでいる β 1–4 結合を分解し、グルコース 2 分子が放出される。

そこで、この反応を簡単に追跡するために、人工基質であるp-ニトロフェニル・グルコピラノシドを使用します。この人工基質も酵素に結合でき、天然基質であるセロビオースと同様に分解されます。人工基質であるp-ニトロフェニル・グルコピラノシドがセロビアーゼにより分解されると、グルコースとp-ニトロフェノールが生成されます（図7）。p-ニトロフェノールが塩基性のpHをもつ溶液（キットに含まれる反応停止液がそうです）と混ざると、黄色に発色します。黄色の強度は存在するp-ニトロフェノール量に比例します。さらに、p-ニトロフェノール1分子あたり、p-ニトロフェニル・グルコピラノシドの1分子が分解されたことになります。このようにセロビアーゼ反応を試験するとき、塩基性溶液を用いてp-ニトロフェノールを発色させるもう1つのメリットは、塩基性pHは酵素変性と反応停止にも働くということです。

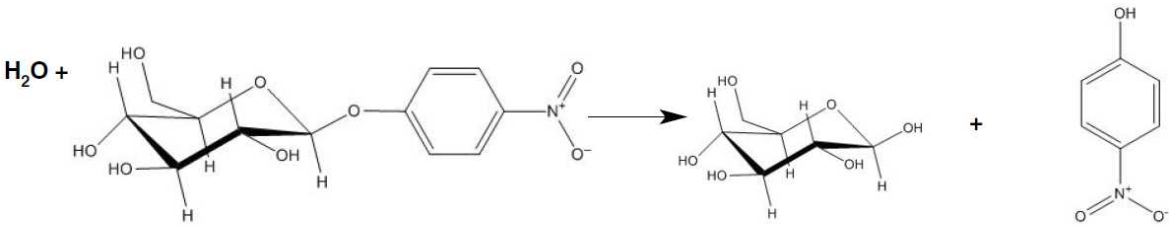


図7. p-ニトロフェニル・グルコピラノシドはセロビアーゼによりグルコースとp-ニトロフェノールに分解される

p-ニトロフェニル・グルコピラノシドがセロビアーゼにより分解されると、グルコース 1 分子と p-ニトロフェノール 1 分子が放出される。p-ニトロフェノールが塩基性溶液中におかれると黄色を呈し、これは簡単な比色定量法により検出される。

生成量の測定

人工基質を使った反応のこの生成物（p-ニトロフェノール）は、塩基の添加によって黄色になるため、どの程度生成されたかが分かります。色が濃いほど生成量が多いということです。生成量を推定する簡単な方法の1つは酵素反応のサンプルの黄色を、一連の既知濃度の標準液（既知量の発色生成物を含む）と比較するものです。一連の標準液の入ったチューブと、自身のサンプルの色とを比較して、最も近いものを推定できます。これにより生成量を推定できます。もしくは、分光光度計（比色計）と呼ばれる機器を使うことができます。これはサンプルに（410 nmの波長の）光線をあてることで、黄色の量を定量的に評価するものです。分光光度計では、サンプルの吸収する光線量を測定します。サンプルの黄色が強いほど、多くの光線が吸収され、サンプルが濃いことが分かります。まず、一連の標準液の吸光度を使って検量線（既知濃度のp-ニトロフェノールが含まれるサンプルの吸光度をプロットにしたもの）を作成します。次に反応で得られたサンプルの吸光度を測定し、検量線を使って吸光度を濃度に変換します。

セロビアーゼによる分解速度の測定

酵素による基質の分解能に影響する要素を明らかにするために、反応速度、すなわち一定時間内の生成量を求めます。セロビアーゼ活性を検討するためには、人工基質であるp-ニトロフェニル・グルコピラノシドの酵素を加え、反応速度を測定します。酵素と基質を、反応に理想的なpH（5.0）をもつバッファーに溶解させます。一定時間後、酵素反応液のサンプルを取り出し、高pHの反応停止液を加えます。これは生成物であるp-ニトロフェノールの発色を助け、同時に、pHを酵素が働く範囲以上に上昇させることで反応を停止させます。時間内のp-ニトロフェノールの生成量を計算し、反応速度を求めることができます。時間を若干延長すると、酵素の反応速度が一定なのか、基質量が減少した結果として速度が低下したのかもわかります。また初期反応速度に対するpH、温度、基質濃度または酵素濃度の影響も調べることができます。

実験前の問題

1. 酵素とはどのような種類の分子のことですか？

2. 酵素の形状がその機能に重要なのはなぜですか？

3. 酵素はどのようにして化学反応を加速させますか？

4. この実験で使う酵素の名前は何ですか？

5. この酵素の実用的、工業的な用途を1つ答えなさい。

6. この酵素の天然の生成物は何ですか？

7. この酵素の天然の基質は何ですか？

8. 一定時間の生成量はどのようにして求めることができますか？

9. 生成速度はどのようにして測定しますか？

実験１：酵素の存在下／非存在下での反応速度の決定

この実験ではp-ニトロフェニル・グルコピラノシドからグルコースとp-ニトロフェノールへの分解速度を、セロビアーゼの存在下と非存在下で比較します。酵素は反応速度を高める分子ですが、反応によって使いきられることはありません。酵素は繰り返して基質の処理を進めるため、基質の分子数に比べて非常に少ない分子数で済みます。

非常に少量を加えることは難しいので、先生方はバッファー液で酵素を希釈しています。これによって非常に少数の酵素分子を含む必要容量を、簡単に加えることができます。ただし、酵素を希釈したバッファーが生成速度に影響しないことを確認するため、バッファーのみを含むコントロール反応液についても、希釈酵素を含む反応液と並行して測定します。

最初の反応チューブでは、基質溶液に酵素を加え初期反応速度（生成量）を求めます。2つめの反応チューブ（コントロール反応液が含まれている）でも、同じ基質に同じバッファーを加えますが、ここには酵素は含まれません。このようにして、酵素の存在下およびコントロールバッファーの存在下での、p-ニトロフェニル・グルコピラノシドからグルコースとp-ニトロフェノールへの分解速度を比較することができます。

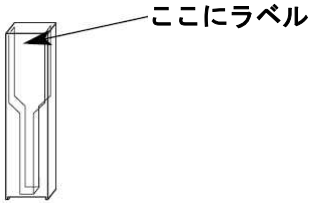
生徒の実験台に用意するもの	**数量**	**（✓）**
1.5 mM基質	1	❒
酵素	1	❒
反応停止液（1倍濃度）	1	❒
バッファー	1	❒
DPTP	4	❒
15 mLコニカルチューブ	2	❒
キュベットに入った比色標準液（S1～S5）	各1本	❒
キュベット	7	❒
マーカーペン	1	❒
DPTP洗浄用の脱イオン水または蒸留水の入ったビーカー	1	❒
ストップウォッチまたはタイマー	1	❒

先生の実験台に用意するもの（任意）	**数量**	**（✓）**
分光光度計	1	❒

プロトコール

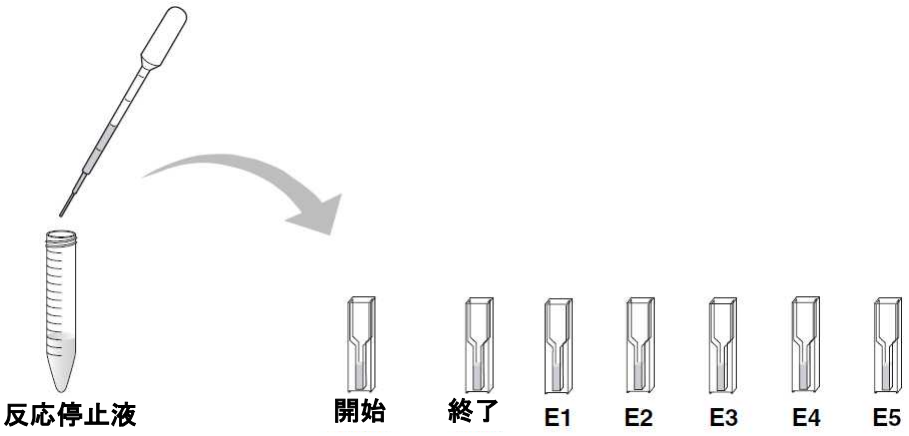
1. 「反応停止液」、「1.5 mM基質」、「酵素」、「バッファー」とラベルされた15 mLコニカルチューブをおきます。それぞれのチューブに自分のイニシャルを書いたラベルをつけます。

2. 5本のキュベットにE1～E5（5つの測定時点用）のラベルを付けます。ラベルはキュベット前面の上部にのみつけます。



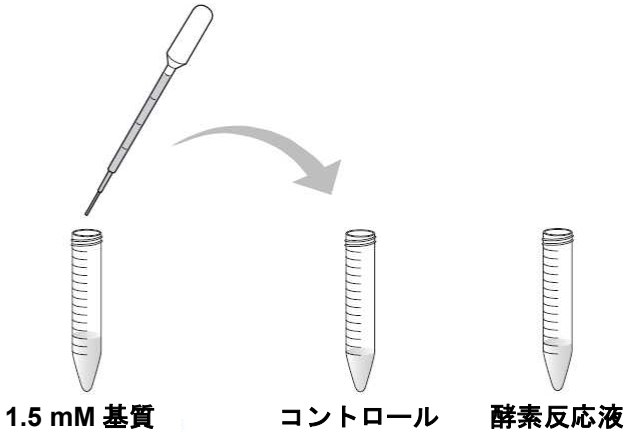
3. 残りの2本のキュベットの上方に、「開始」と「終了」のラベルをつけます。このキュベットは、反応開始時と終了時でのコントロールとなり、いずれのキュベットにも酵素は加えません。

4. 新しいDPTPを使って、ラベルを付けた7本のキュベットそれぞれに反応停止液500 µLを移します。反応停止液は強塩基性ですので、皮膚や衣類に付かないようにしてください。このDPTPは水でよく洗い流し、後の実験にとっておきます。



5. 空の15 mLコニカルチューブ2本を用意します。1本には「酵素反応液」、もう1本に「コントロール」とラベルをつけます。

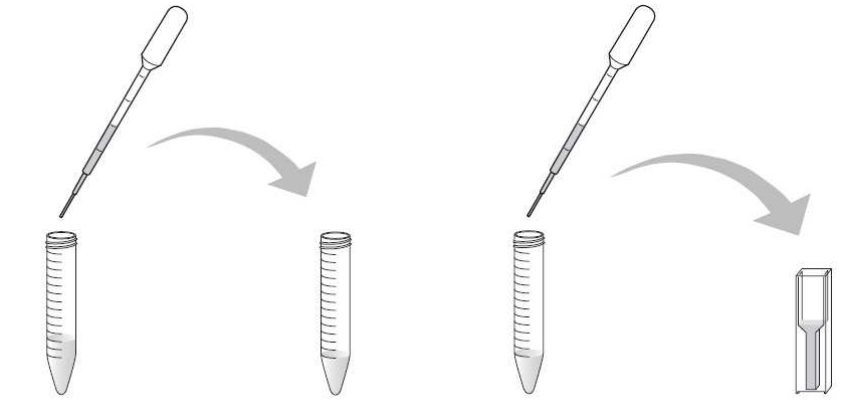
6. 新しいDPTPを使って、1.5 mM基質2 mLを「酵素反応液」とラベルした15 mLコニカルチューブに移します。同じDPTPを使って、1.5 mM基質1 mLを「コントロール」とラベルしたコニカルチューブに移します。このDPTPは水でよく洗い流し、後の実験にとっておきます。



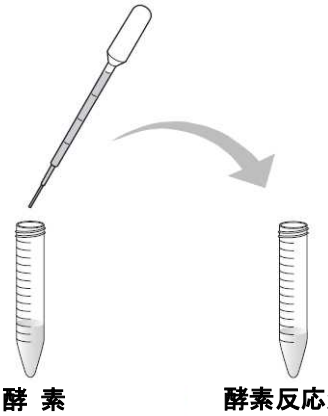
7. 1本のDPTPは酵素（Enzyme）の「E」、もう1本はコントロール（Control）の「C」とラベルします。**酵素反応チューブには「E」とラベルしたDPTPのみを、コントロール反応チューブには「C」とラベルしたDPTPのみを使用します。**

8〜11の手順は実験を進める前によく読んで理解しておいてください。これらの手順にはタイムリミットがあります!

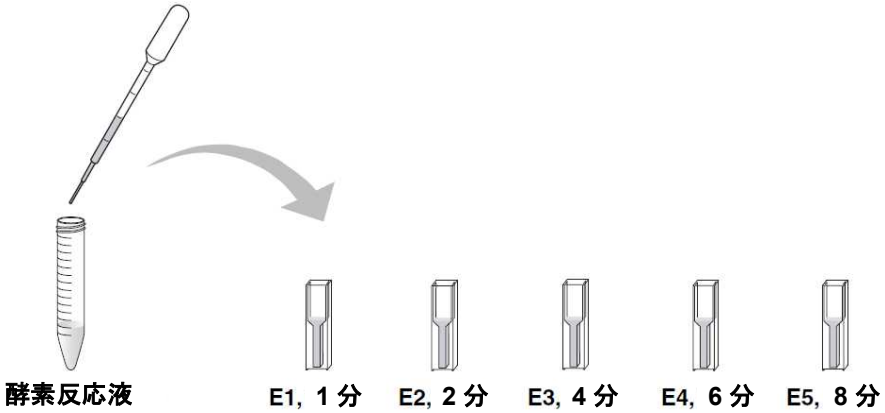
8. 「C」とラベルしたDPTPを使って、バッファー500 µLを「コントロール」とラベルした15 mLコニカルチューブに移し、穏やかに混ぜます。基質とバッファーを混ぜたのち、この溶液500 µLを取り出して「開始」とラベルしたキュベットに加えます。



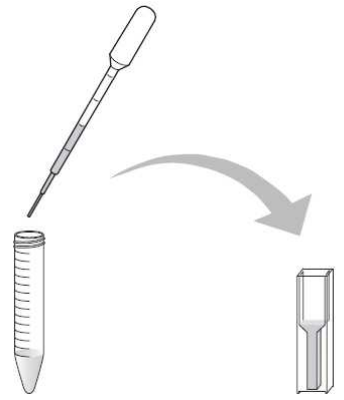
9. 「E」とラベルしたDPTPを使って、酵素1 mLを「酵素反応液」とラベルした15 mLコニカルチューブに移します。穏やかに混ぜ、タイマーをスタートさせます。これは酵素反応開始時点となります。



10. 下表に示す時点で、「E」とラベルしたDPTPを使って「酵素反応液」チューブから溶液500 µLを取り出し、反応停止液の入っている該当のラベルのついたキュベットに加えます。



11. すべての酵素サンプルを集めたのち、「C」とラベルしたDPTPを使って「コントロール」反応チューブから500 µLを取り出し、「終了」とラベルしたキュベットに加えます。



コントロール　　終了, 8 分

時間（分）	酵素キュベット	コントロールキュベット
0（開始時）		開始
1	E1	
2	E2	
4	E3	
6	E4	
8	E5	終了

12. DPTPを大量の水で洗い流し、後の実験にとっておきます。分析が終了した後、反応コニカルチューブおよびキュベットを大量の水で洗い流し、後の実験にとっておきます。

注：未使用の原液や、標準液の入ったキュベットは捨てないでください。次の実験にも使用します。

結 果

生成量の定性的測定

1. S1～S5のラベルがついた標準液キュベット5本を実験台の上におきます。その濃度は表1に示しています。7本の全キュベット（コントロールおよび反応キュベット）を白い背景の前におき、標準キュベットと比較します。自分のコントロールキュベットと酵素反応キュベットに最も近い標準液を、表2に記録します。

表1. p-ニトロフェノール標準液

標準液	P-ニトロフェノール量（nmol*）
S1	0
S2	12.5
S3	25
S4	50
S5	100

*1 nmol = 1ナノモル $= 1 \times 10^{-9}$ mol = 0.000000001 mol

表2. 標準キュベットに対する反応キュベットの比較

時間（分）	キュベット	最も近い標準液	P-ニトロフェノール量（nmol）
0	開始		
8	終了		
1	E1		
2	E2		
4	E3		
6	E4		
8	E5		

2. 分光光度計がない場合は、次をとばして「結果の分析」に進んでください。

生成量の定量的測定

1. S1～S5のラベルがついた標準液キュベット5本を実験台の上におきます。その濃度は表1に示しています。S1とラベルがついたキュベットを410 nmで測定し、分光光度計のブランクとします。残りの標準液について410 nmでの吸光度を測定し、表3に記録します。この情報を使って、存在するp-ニトロフェノール量と410 nmでの吸光度を相関させる検量線を作成します。

表3. 標準液の吸光度

標準液	P-ニトロフェノール量（nmol）	410 nmでの吸光度
S1	0	0.00
S2	12.5	
S3	25	
S4	50	
S5	100	

2. 酵素触媒反応キュベット（E1～E5）とコントロールキュベット（開始、終了）の吸光度を410 nmで測定し、結果を表4に記録します。この情報を使って、反応キュベット中に生じる生成物（p-ニトロフェノール）量を求めます。

表4. 検量線を使ったp-ニトロフェノール生成量の測定

時間（分）	キュベット	検量線から求めたP-ニトロフェノール量（nmol）	410 nmでの吸光度
0	開始		
8	終了		
1	E1		
2	E2		
4	E3		
6	E4		
8	E5		

3. 吸光度から生成量（ナノモル）を求めます。生成物（p-ニトロフェノール）の吸光度はキュベット中に存在するp-ニトロフェノール量に直接相関します。言い換えると、溶液の黄色が強いほど、溶液中のp-ニトロフェノール量は多く、410 nmでの吸光度が高いことになります。既知量のp-ニトロフェノールを含む標準液について吸光度をプロットすることで（検量線と呼ばれる）、皆さんの酵素分析サンプルに含まれるp-ニトロフェノールの量を求めることができます。
   図8に示した例では、黒いひし形（◆）が5つの標準液の吸光度を表しています。このデータポイントすべてを通る近似線を引きます。黒丸（●）はE3のデータポイントを示しており、この吸光度は0.73と測定されました。この値に相当する生成量を求めるには、y軸上の吸光度で（おおよそ）0.73をみて、これを水平にたどって検量線と交わる点をとります。この点からX軸（p-ニトロフェノール量）に垂線をおろし、グラフから値を直接読み取ります。この場合、約44 nmolになります。残りのデータポイントについても同様にします。

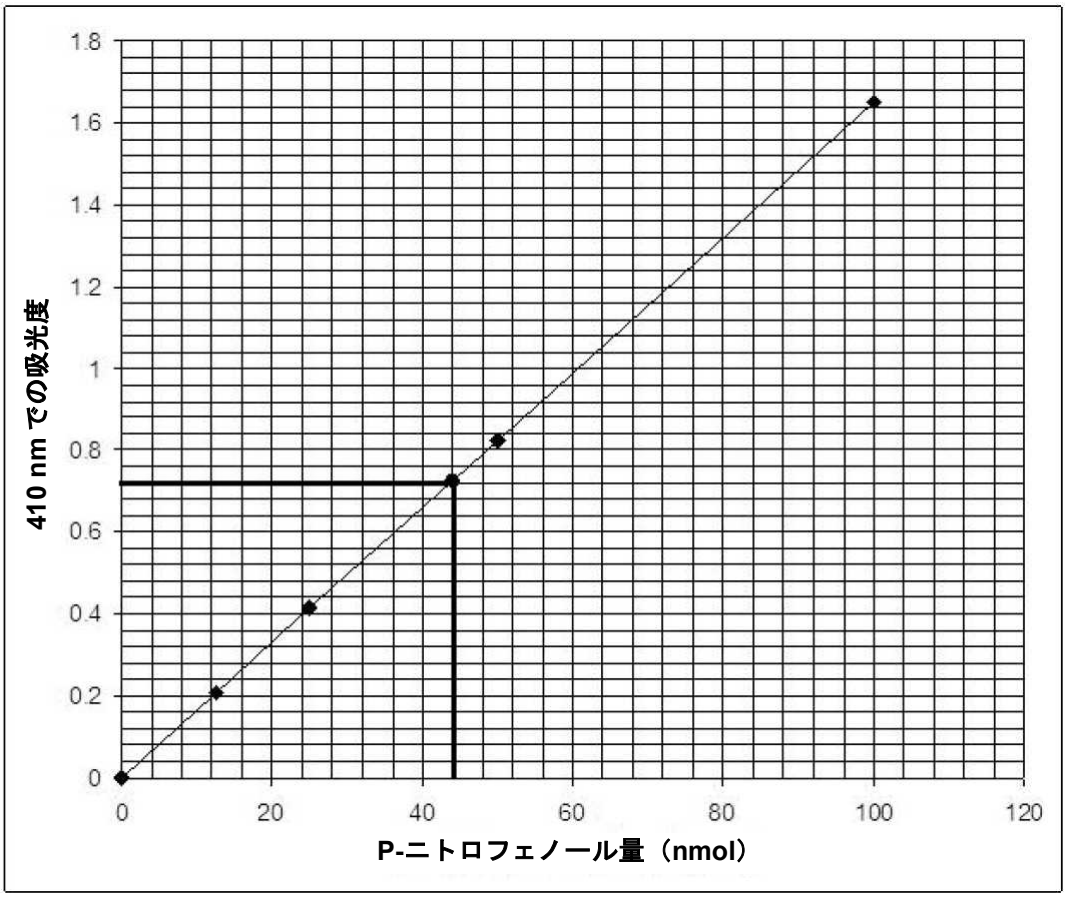


図8. 検量線の例
p-ニトロフェノールの吸光度を、既知量の p-ニトロフェノール標準液（S1～S5）に対してプロット。

表3のデータを使って検量線を作成します。図9で各標準液の吸光度をプロットし、全データポイントを通る近似線を描きます。47ページの例にあるように、5つの時点（E1～E5）と非触媒反応（開始と終了）の吸光度をプロットし、各時点について相当する生成量を求めます。この情報を表4に記録します。

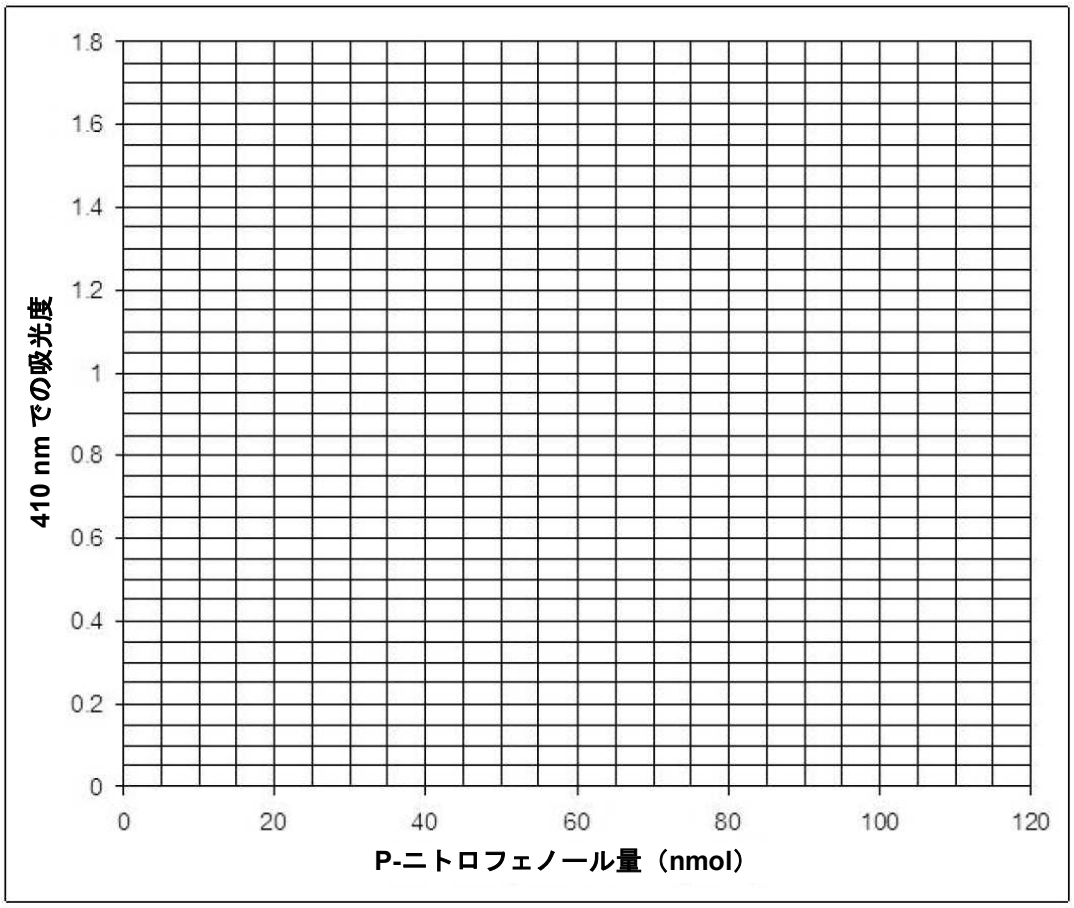


図9. 既知量のp-ニトロフェノール標準液（S1～S5）に対してp-ニトロフェノールの吸光度をプロットし、検量線を作成。

結果の分析

1. 初期生成速度

反応の最初には、酵素が出会う基質は豊富にあります。しかし反応が進むにつれ、基質は生成物に変換されるため、利用できる基質は減ってきます。それぞれの時点で生成される量をグラフにすると、このデータを使って、酵素の存在下／非存在下での初期生成速度を求めることができます。

図10では生成物（p-ニトロフェノール）量を時間に対してプロットし初期生成速度を求めています。速度の単位はnmol/分です。

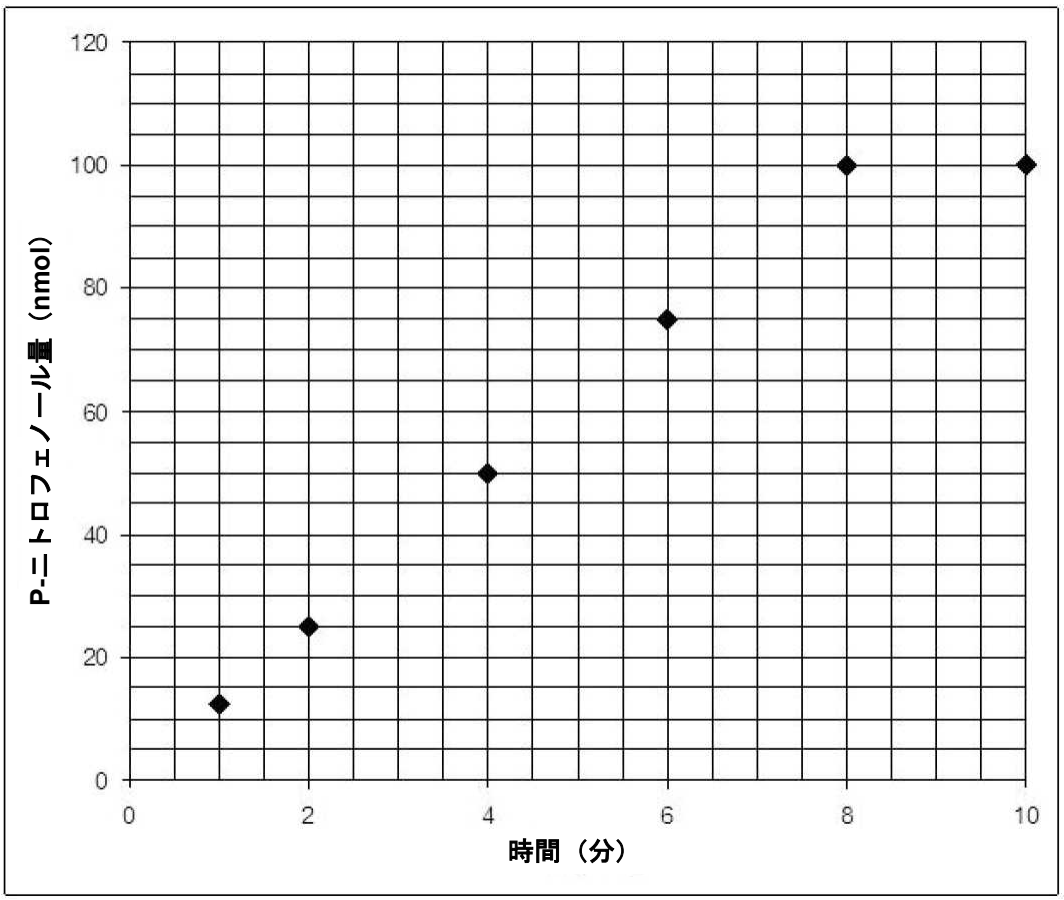


図10. 酵素反応の速度曲線の例。
生成量を時間に対してプロットし、初期反応速度を求める。

生成量が線形に増加している部分があります。これは初期反応速度と呼ばれます。上述のグラフでは、このような線形部分は0から8分の間です。

初期生成速度 = 線の傾き = y軸上の変化量/x軸上の変化量

初期生成速度 =（100 nmol – 12.5 nmol）/（8分– 1分）= 12.5 nmol/分

2. 基質から生成物への変換

図10に示したように、表2または表4のデータを使って、時間に対する生成P-ニトロフェノール量を図11にプロットします。データポイントを通り近似線を描きます。

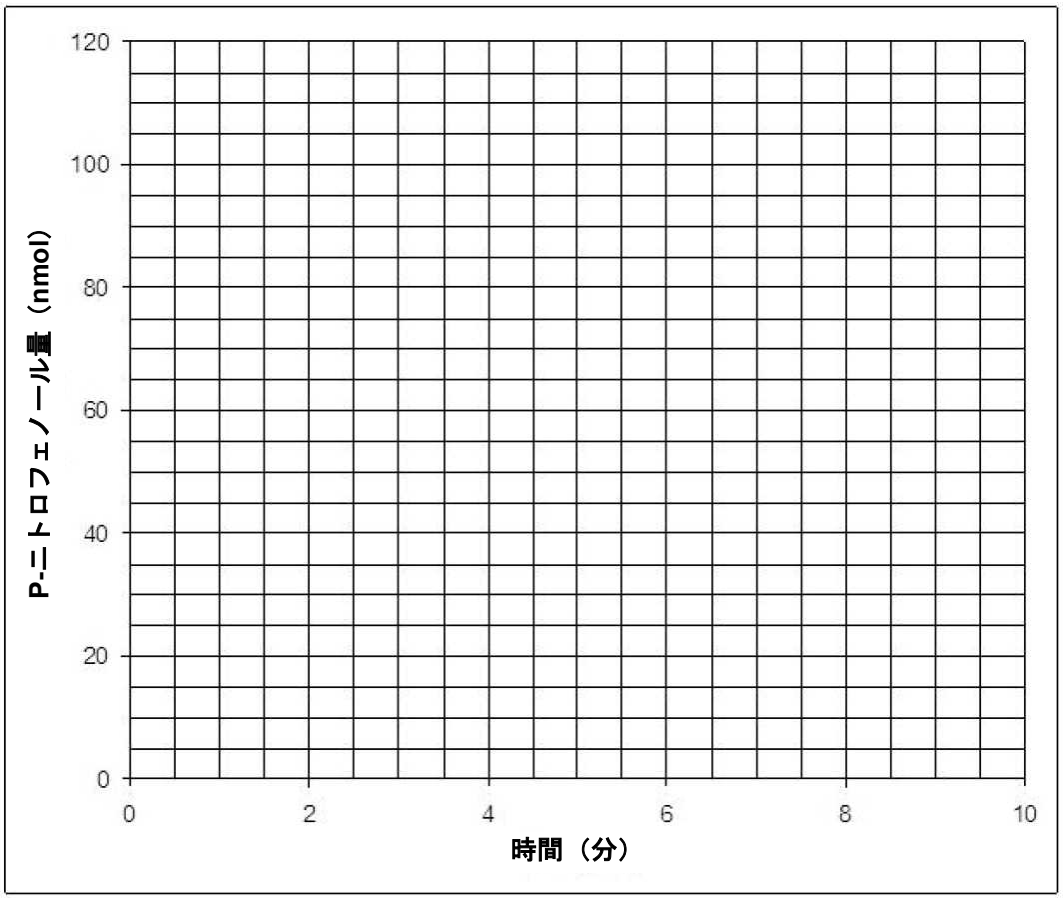


図11. セロビアーゼの反応速度曲線。
生成量を時間に対してプロットし、初期反応速度を求める。

反応の最初には、酵素が出会う基質は豊富にあり、生成物がつくられます。生成物濃度が線形に増加する部分を確認します。

時間の関数として生成物濃度を描いたグラフを用いることで、豊富な基質があるときの生成速度を求めることができます。

自分のデータについて次の計算をしましょう。

酵素存在下での初期生成速度= _____nmol/分

酵素非存在下での生成速度= _____nmol/分

実験1：分析問題

1. 反応が起きている間、酵素反応液とコントロール反応液の入ったコニカルチューブに何か変化を観察しましたか？

2. 酵素／基質の混合液を反応停止液に加えた後、各キュベットの溶液に何が起きましたか？

3. この実験で起きた化学反応を説明しなさい。

4. 酵素が加えられていないコントロールと比べた、酵素触媒反応液中の生成物の量を説明しなさい。

5. 15分後で調べたら、8分後に調べたときと生成量は増えると思いますか？それはなぜですか？

6. 酵素により生成される生成量（nmol）は、どのように推定しますか？

7. サンプルにより吸収される光線量は、なぜ生成量に比例するのですか？

8. 測定した吸光度から初期生成速度を求めなさい。**ヒント：**生成速度は吸光度の変化で測定されるもので（単位／分またはnmol/分）、0分と1分の間の線の傾きです。

9. 生成速度は時間によっても一定ですか？**ヒント：**線の傾きは一定ですか？それとも変化していますか？

実験 2：反応速度に対する温度の影響の決定

温度も反応速度に影響することがあります。高温になると溶液中の基質と酵素分子の運動速度が上がり、衝突回数が増え、その結果反応速度も上昇します。しかし、ある温度まで達すると、酵素が適当な形状を維持するための力が弱まり、酵素の形状が変化します。酵素の形状が変化する（変性する）温度は、その酵素の特性によって異なります。沸点に近い温度でも安定している酵素もありますが、室温で変性するものもあります。ただし、ほとんどの酵素は中程度の温度（20～40°C）で最もよく働きます。通常、本来その酵素が機能している環境から、最もよく働く実験条件を予測することができます。例えば、温泉や堆肥内で生息している細菌が生成する酵素は高温でも働きますが、北極で生息している細菌が生成する酵素は、低温で働くことができます（Groudieva 2004）。

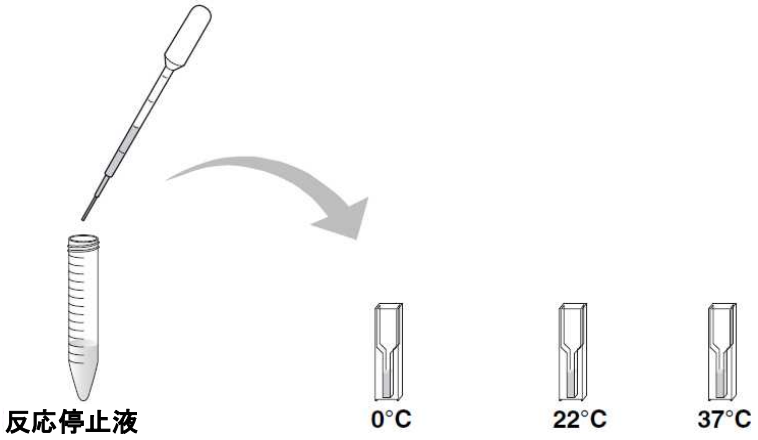
生徒の実験台に用意するもの	数量	（✓）
1.5 mM基質	1	❒
酵素	1	❒
反応停止液	1	❒
DPTP	4	❒
実験1の比色標準液（S1～S5）	各1本	❒
マイクロチューブ、1.5 mL	6	❒
キュベット	3	❒
マーカーペン	1	❒
氷水を入れたビーカー	1	❒
37°Cの水が入ったビーカー	1	❒
温度計	1	❒
DPTP洗浄用の脱イオン水または蒸留水の入ったビーカー	1	❒
ストップウォッチまたはタイマー	1	❒

先生の実験台に用意するもの（任意）	数量	（✓）
分光光度計	1	❒

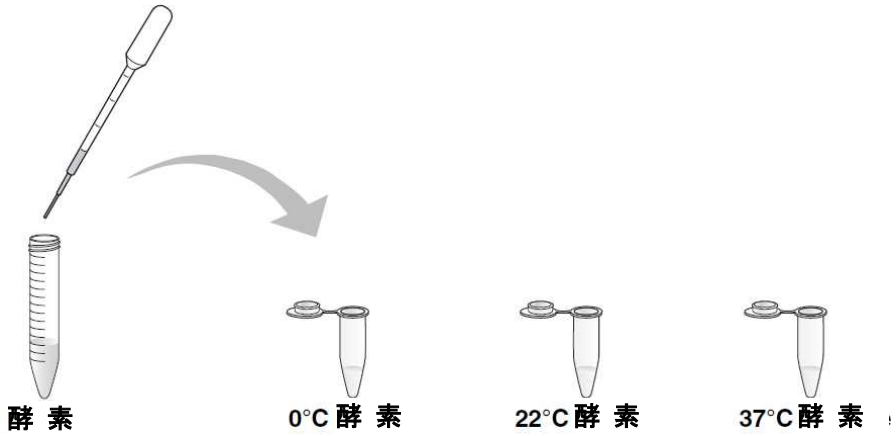
プロトコール

1. キュベットに「0°C」、「22°C」、「37°C」とラベルをつけます。ラベルはキュベット前面の上部にのみつけます。

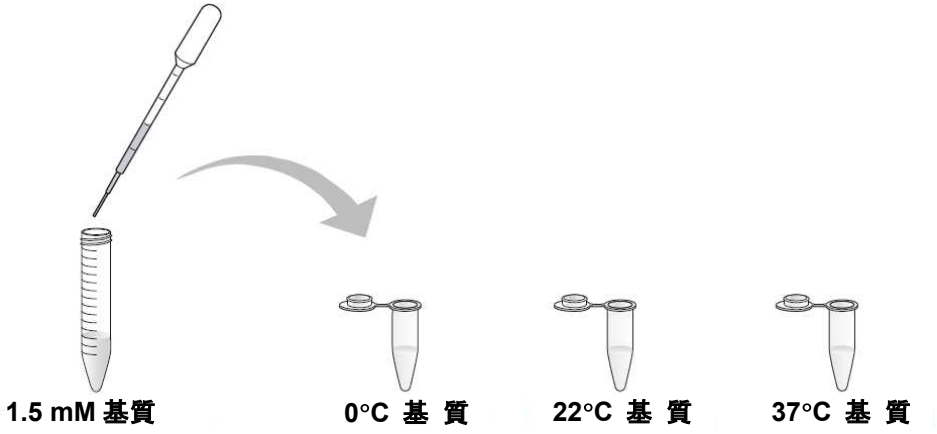
2. 新しいDPTPを使って反応停止液500 µLをそれぞれのキュベットに移します。このDPTPは水で十分に洗い、とっておきます。



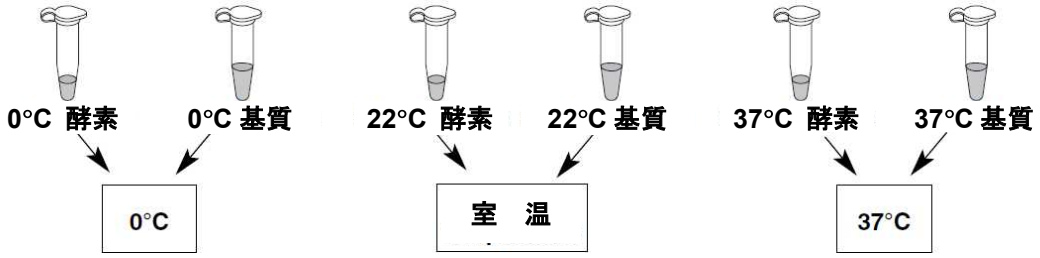
3. 1.5 mLマイクロチューブ3本に「0°C酵素」、「22°C酵素」、「37°C酵素」とラベルをつけます。新しいDPTPを使って、酵素250 µLをそれぞれのマイクロチューブに移します。このDPTPは水で十分に洗い流します。



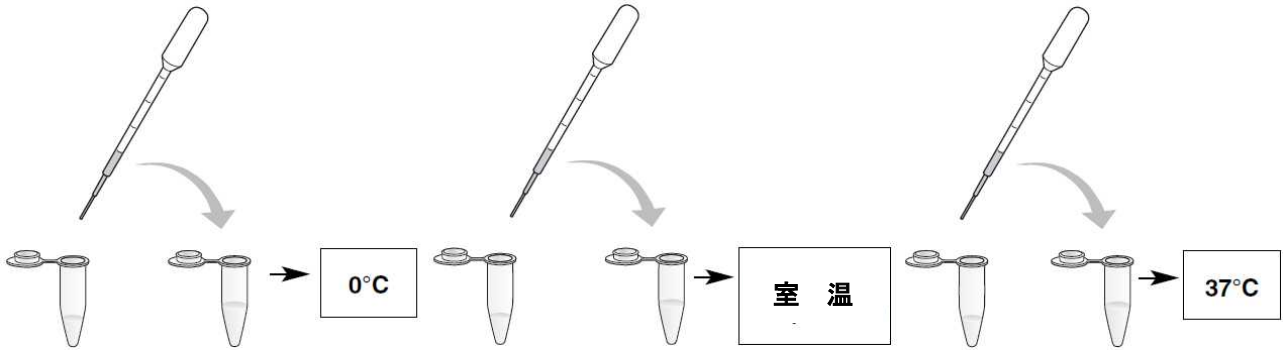
4. 1.5 mLマイクロチューブ3本に「0°C基質」、「22°C基質」、「37°C基質」とラベルをつけます。新しいDPTPを使って、1.5 mM基質500 µLをそれぞれのマイクロチューブに移します。このDPTPは水で十分に洗い流します。



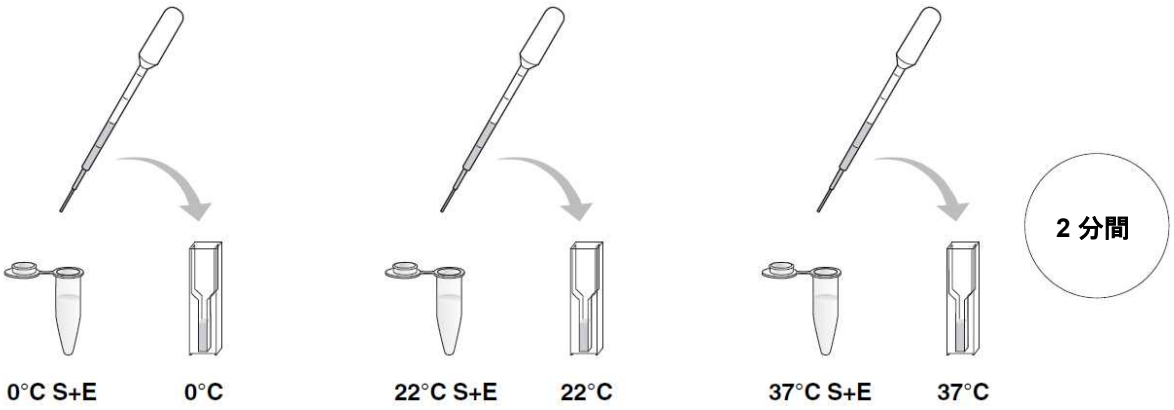
5. 「0°C酵素」、「0°C基質」とラベルしたマイクロチューブを氷の入った容器に入れます。「22°C酵素」、「22°C基質」とラベルしたマイクロチューブを実験台の上におきます。「37°C酵素」、「37°C基質」とラベルしたマイクロチューブを、37°Cのぬるま湯を入れたビーカー内におきます。それぞれの温度に5分以上おいて平衡化させます。



6. ストップウォッチを用意します。新しいDPTPを使って、「0°C酵素」とラベルしたチューブから酵素250 µLを「0°C基質」とラベルしたチューブに移し、この酵素と基質の入ったチューブを氷の上に戻します。同じDPTPを使って室温の酵素を室温の基質溶液に加え、このチューブを実験台の上に戻します。同じDPTPを使って37°Cの基質を37°Cの酵素溶液と混ぜ、37°Cのウォーターバスに戻します。ストップウォッチをスタートさせます。



7. 2分後、それぞれの温度反応に新しいDPTPを使って、反応液500 µLを、反応停止液の入った該当のラベルのついたキュベットに移します。キュベットに入ったすべての溶液を、約5分間で室温に戻します。



8. すべてのサンプルを分析した後、この実験で使用したDPTPおよびキュベットを大量の水で洗い流し、後の実験にとっておきます。

注：未使用の原液や、標準液の入ったキュベットは捨てないでください。次の実験にも使用します。

様々な温度での生成量の定性分析

1. 「S1～S5」とラベルがついた標準液のキュベット5本を実験台に用意します。0°C、22°Cおよび37°Cのキュベットのサンプルを用意し、それぞれの温度で反応したキュベットの色に一番合っている標準液を確認します。各温度の反応液に合った標準液の濃度を書き写します（表5から表6へ）。

表5. p-ニトロフェノール標準液

標準液	P-ニトロフェノール量（nmol*）
S1	0
S2	12.5
S3	25
S4	50
S5	100

*1 nmol = 1ナノモル $= 1 \times 10^{-9}$ mol = 0.000000001 mol

表6. p-ニトロフェノール標準液に基づく、3つの温度で生成されたp-ニトロフェノールの測定

温度	最も近い標準液	生成P-ニトロフェノール量（nmol）
0°C		
約22°C（室温）		
37°C		

2. 分光光度計がない場合は、次をとばして「結果の分析」に進んでください。

様々な温度での生成量の定量分析

1. S1の標準液を410 nmで測定し、分光光度計のブランクとし、3本のキュベットの吸光度を測定します。吸光度を表7に記録します。

2. 実験1と同じプロトコールにしたがい、分光光度計で測定した吸光度の単位から生成量（nmol）に変換させ、この値を表7の3列目に記入します。

表7. 検量線に基づく3つの温度でのp-ニトロフェノール生成量の測定（図8と同様）

温度	410 nmでの吸光度	生成P-ニトロフェノール量（nmol）
0°C		
約22°C（室温）		
37°C		

結果の分析

1. 3つの温度それぞれの初期反応速度を求めます。p-ニトロフェノール量は1点の時点（2分後）でのみ測定しているため、0分のp-ニトロフェノール量は0 nmolと推定されます。

例： 37°Cのサンプルにおける2分後の410 nmでの吸光度は0.35で、これは標準液S3に最も近く見えます。（標準液を使って）定性的に分析したとき、p-ニトロフェノールは約25 nmolであるということです。定量的には、実験1で作成した検量線を用いてp-ニトロフェノール量を求めたとき、吸光度0.35で約22 nmolに相当しています。

定性的データによる初期速度 =（25 nmol – 0 nmol）/（2分間 – 0分）= 12.5 nmol/分

定量的データによる初期速度 =（22 nmol – 0 nmol）/（2分間 – 0分）= 11 nmol/分

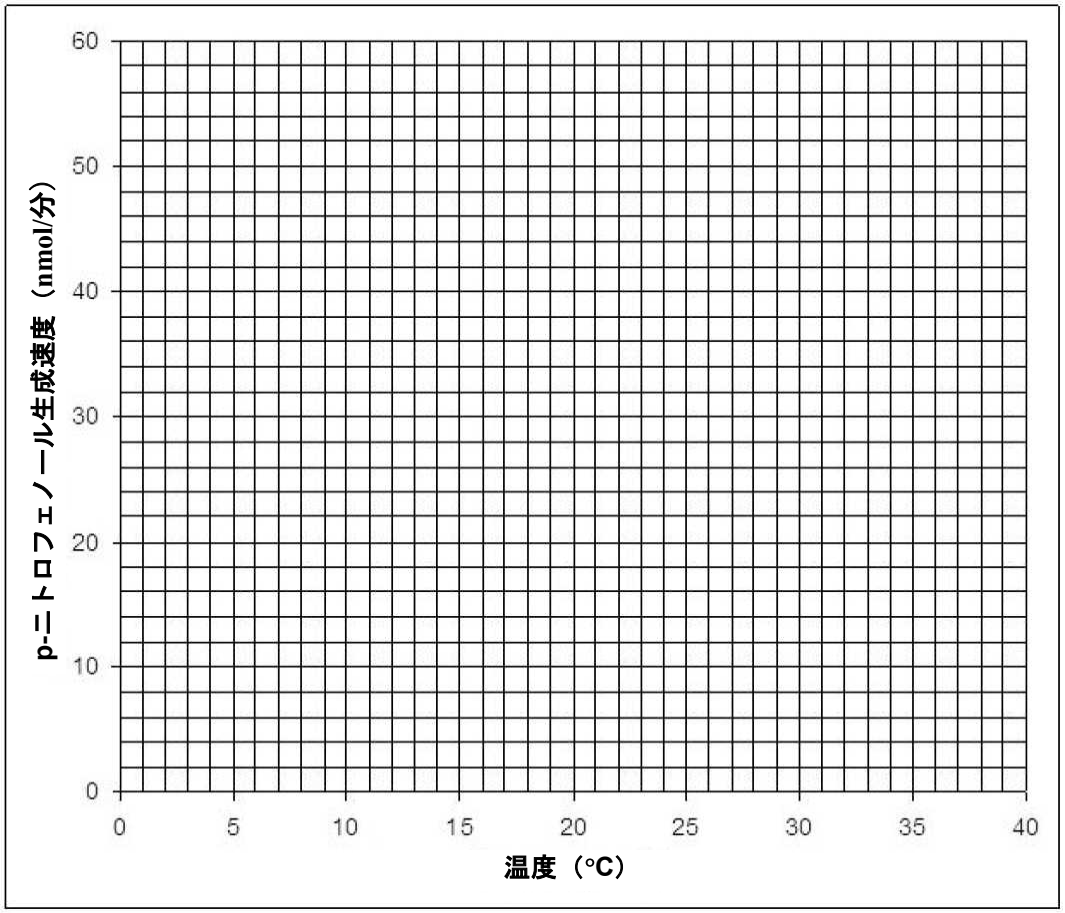
自分のデータについて次の計算をしましょう。

0°Cでの初期生成速度= _____nmol/分

22°C（室温）での初期生成速度= _____nmol/分

37°Cでの初期生成速度= _____nmol/分

2. 酵素反応速度に対する温度の影響をプロットします。



実験2：分析問題

1. 各温度での反応について、どのように初期速度を求めることができますか？

2. この酵素の至適温度は何℃だと思いますか？それはなぜですか？

3. 高い温度で化学反応が速く進むのはなぜですか？

4. 低い温度で化学反応が遅く進むのはなぜですか？

5. 超高温ではほとんどの酵素反応の速度は低下しますが、それはなぜですか？

6. もしあなたが科学者で、この酵素を使ってグルコースを生成しようという場合、何℃でこの反応を進めるべきですか？

7. この酵素を産生する微生物は、どのような環境で生息していると思いますか？その理由を説明しなさい。

チャレンジ問題

1. 酵素の三次元構造内の結合で、高温で切断されるものはどのような結合ですか？切断されないものはどの結合ですか？

2. R基間の共有結合は、どのアミノ酸の間で起きていますか？

3. 最大の生成速度となる温度を使ったときのデメリットは何でしょうか

実験 3：反応速度に対する pH の影響の決定

酵素がその基質と相互作用する1つの方法は、1分子上の荷電基が、ほかの分子上の反対の荷電基に引き寄せられるというものです。しかし、基質と酵素が出会うpHが変化すると、その正および負の荷電基がその電荷を変化させたり、電荷を失うこともあります。pHは酵素に影響するだけでなく、基質にも影響する可能性があります。この全体の結果として、酵素と基質は最適な状態では相互作用しなくなります。微生物の生息条件によって酵素の至適温度に高低があるように、酵素の至適pHにも違いがあります。例えば、胃の中に存在する酵素はpH 3程度の低いpH（酸性条件）で最もよく働きますが、小腸に分泌される膵酵素は中性から塩基性条件（pH 7.2～9.0）でのみ働きます。

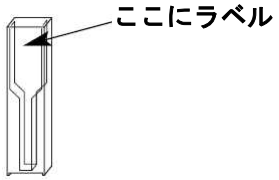
生徒の実験台に用意するもの	**数量**	**（✓）**
3.0 mM基質	1	❒
酵素	1	❒
反応停止液	1	❒
実験1からのキュベットに入った比色標準液（S1～S5）	各1本	❒
1.5 mLマイクロチューブ（「pH 5.0」、「pH 6.3」、「pH 8.6」のラベルがついたもの）	各1本	❒
DPTP	4	❒
キュベット	3	❒
マーカーペン	1	❒
DPTP洗浄用の脱イオン水または蒸留水の入ったビーカー	1	❒
ストップウォッチまたはタイマー	1	❒

先生の実験台に用意するもの（任意）	**数量**	**（✓）**
分光光度計	1	❒

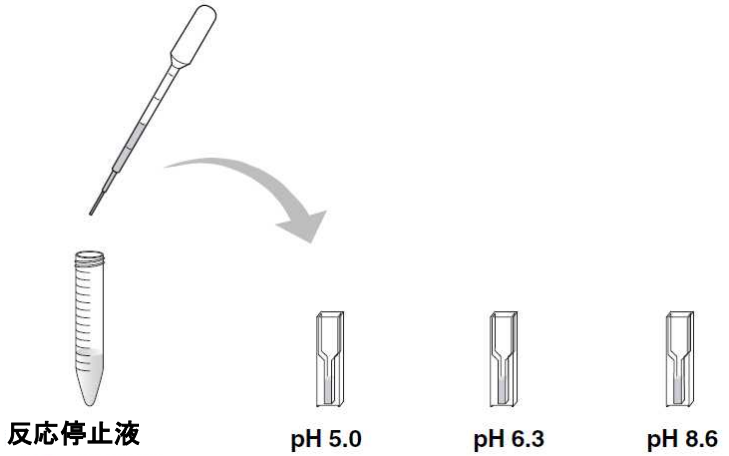
注：この実験に使用する基質濃度は、これ以前の実験で使用したものとは異なります。この実験での基質濃度は、pH調整バッファーを加えたときに希釈されることを考え、3.0 mMを使います。

プロトコール

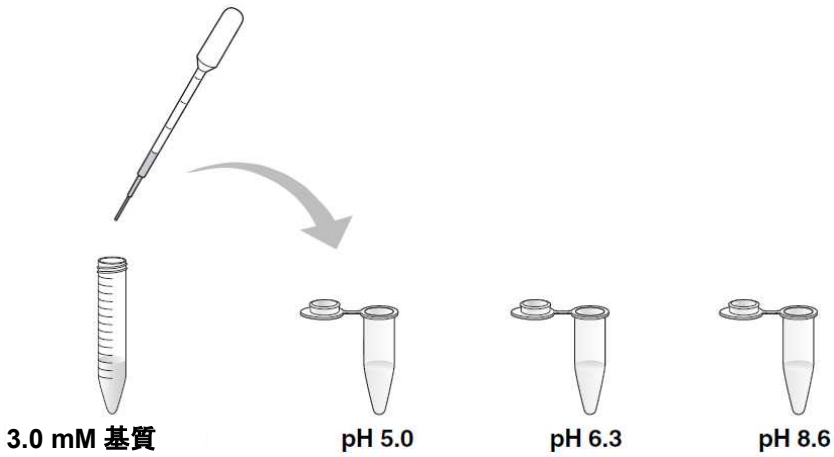
1. キュベットに「pH 5.0」、「pH 6.3」、「pH 8.6」のラベルをつけます。ラベルはキュベット前面の上部にのみつけます。



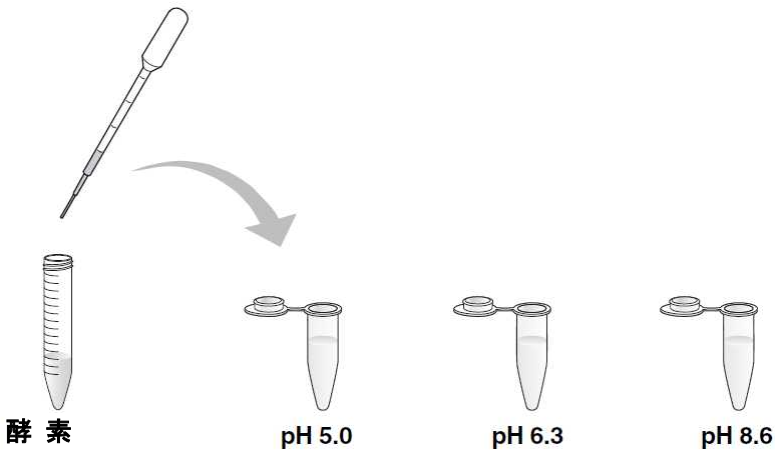
2. 新しいDPTPを使って反応停止液500 µLをそれぞれのキュベットに移します。このDPTPはきれいな水で十分に洗います。



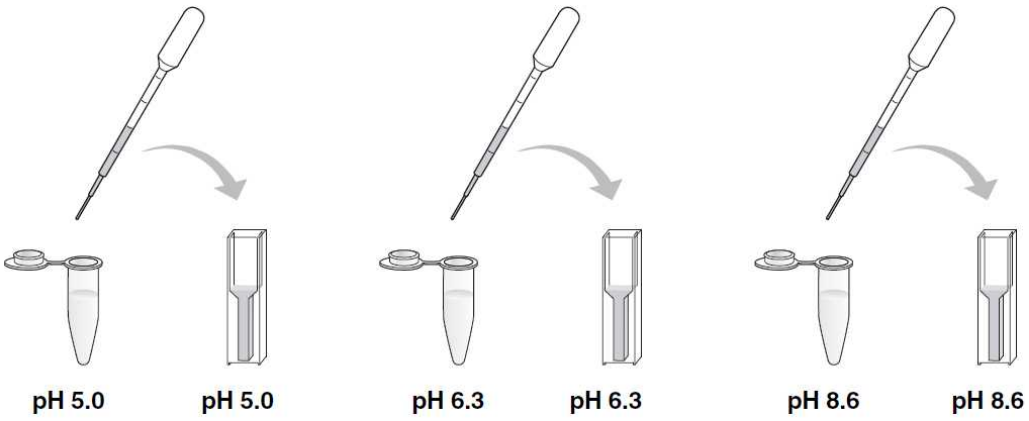
3. 新しいDPTPを使って3.0 mM基質250 µLを、先生が「pH 5.0」、「pH 6.3」、「pH 8.6」とラベルしておいたそれぞれのマイクロチューブに移します。このDPTPは水で十分に洗います。



4. ストップウォッチを用意します。新しいDPTPを使って、酵素250 µLをラベルのついた各マイクロチューブに加え、ストップウォッチをスタートさせます。



5. 2分後、それぞれのpH反応ごとに新しいDPTPを使って、反応液500 µLを、反応停止液の入った該当のラベルのついたキュベットに移します。



6. すべてのサンプルを分析した後、この実験で使用したDPTPおよびキュベットを大量の水で洗い流し、後の実験にとっておきます。

注：未使用の原液や、標準液の入ったキュベットは捨てないでください。次の実験にも使用します。

様々なpHレベルでの生成量の定性分析

1. 「S1～S5」とラベルがついた標準液のキュベット5本を、実験台に用意します。pH 5.0、pH 6.3およびpH 8.6のキュベットのサンプルを用意し、それぞれのキュベットの色に一番合っている標準液を確認します。各pHの反応サンプルに合った標準液の濃度を書き写します（表8から表9へ）。

表8. p-ニトロフェノール標準液

標準液	P-ニトロフェノール量（nmol*）
S1	0
S2	12.5
S3	25
S4	50
S5	100

*1 nmol = 1 ナノモル $= 1 \times 10^{-9}$ mol = 0.000000001 mol

表9. p-ニトロフェノール標準液に基づく、3つのpHで生成されたp-ニトロフェノールの測定

pH	最も近い標準液	生成P-ニトロフェノール量（nmol）
pH 5.0		
pH 6.3		
pH 8.6		

2. 分光光度計がない場合は、次をとばして「結果の分析」に進んでください。

様々なpHでの生成量の定量分析

1. S1の標準液を410 nmで測定し、分光光度計のブランクとし、3本のキュベットの吸光度を測定します。吸光度を表10に記録します。

2. 実験1と同じプロトコールにしたがい、分光光度計で測定した吸光度の単位から求めた生成量を濃度（nmol）に変換します。この値を表10の3列目に記入します。

表10. 検量線に基づく3つのpHでのp-ニトロフェノール生成量の測定（図8と同様）

pH	410 nmでの吸光度	生成P-ニトロフェノール量（nmol）
pH 5.0		
pH 6.3		
pH 8.6		

結果の分析

1. 3つのpHそれぞれの初期反応速度を求めます。p-ニトロフェノール量は1点の時点（2分後）でのみ測定しているため、0分のp-ニトロフェノール量は0 nmolと推定されます。

例：pH 6.3のサンプルにおける2分後の410 nmでの吸光度は0.14で、これは標準液S2に最も近く見えます。（標準液を使って）定性的に分析したとき、p-ニトロフェノールは約12.5 nmolであるということです。定量的には、実験1で作成した検量線を用いてニトロフェノール量を求めたとき、吸光度0.14で約9 nmolに相当しています。

定性データの初期速度＝（12.5 nmol – 0 nmol）/（2分 – 0分）＝約6 nmol/分
定量データの初期速度＝（9 nmol – 0 nmol）/（2分 – 0分）＝4.5 nmol/分

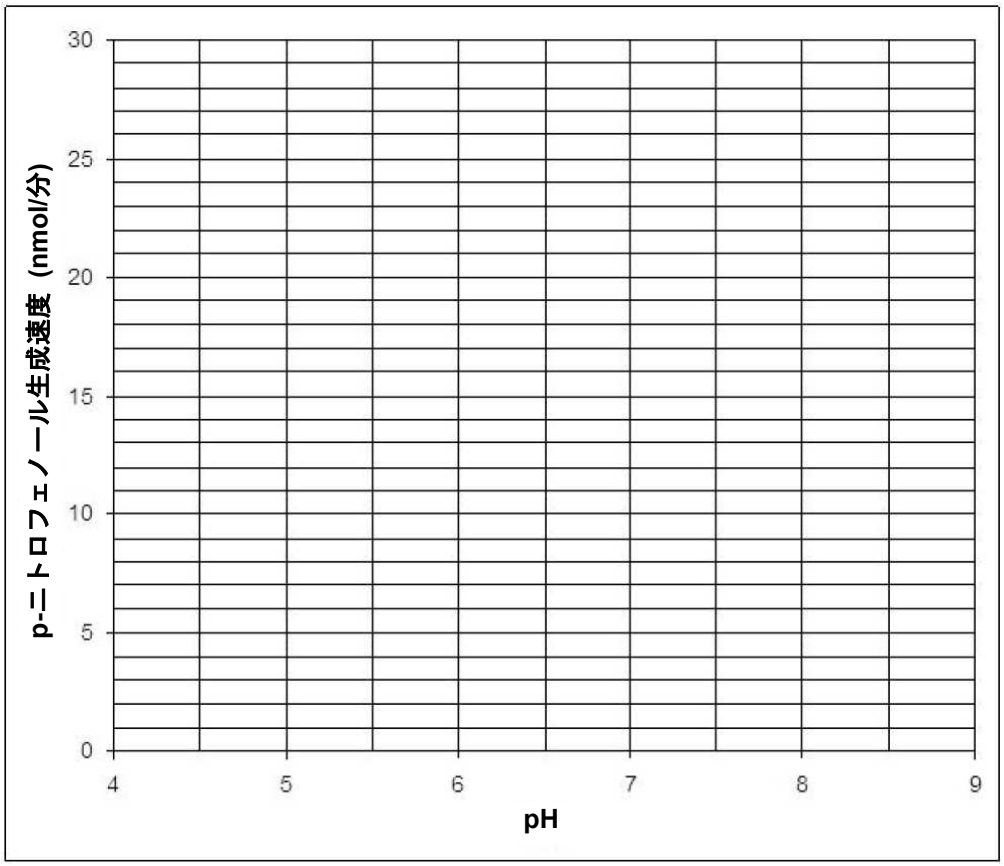
自分のデータについて次の計算をしましょう。

pH 5.0での初期生成速度=_____nmol/分

pH 6.3での初期生成速度=_____nmol/分

pH 8.6 での初期生成速度=_____nmol/分

2. 酵素反応速度に対するpHの影響をプロットします。



実験3：分析問題

1. 各pHに対する初期反応速度はどのように求められましたか？

2. この酵素の至適pHはいくつだと思いますか？それはなぜですか?

3. 超高pHまたは低pHではほとんどの酵素反応の速度は低下しますが、それはなぜですか？

4. この酵素を産生する微生物は、どのような環境で生息していると思いますか？その理由を説明しなさい。

実験 4：反応速度に対する酵素濃度の影響の決定

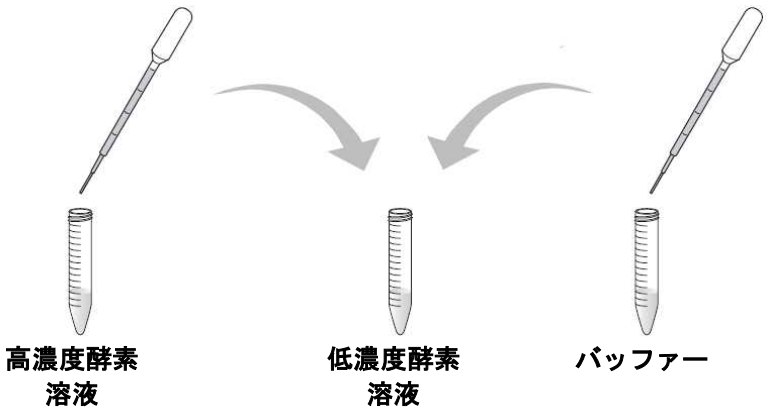
この実験では、初期反応速度と生成量に対する酵素濃度変化の影響を調べます。酵素濃度の影響を単純に考える1つの方法として、既知数の木が生えていて、たくさんの木の実がある小さな森にいる「リス」を考えてみるとよいでしょう。リスの最終目標はすべての木の実を集めることです。もし1匹だけだとしたら、木から木へと遠い距離を飛び回ってすべての木の実を集めますが、もし十分な時間があるとしたら、これがすべての木に飛び乗ってすべての木の実を見つけ、集めるでしょう。数多くのリスがいたとしたら、ずっと早く木の実を集めあげるでしょうが、最終的に集められる数はリス1匹の場合と変わりません。酵素濃度の上昇はこれと同様の作用をします。初め、基質が豊富にある状態では、酵素が多いほど反応は早く進みます。しかし、多くの酵素による反応と比較的少ない酵素による反応では、基質全体の働き（木の実を探す働き）は一定で、十分な時間が与えられればすべての基質が生成物に変換されます。反応速度に対する酵素濃度の影響を明らかにする例として、Peggy Skinnerが開発したToothpickaseを利用することができます。（http：//www.accessexcellence.org/AE/ATG/data/released/0166-PeggySkinner/）

生徒の実験台に用意するもの	数量	（✓）
1.5 mM基質	1	❒
高濃度酵素溶液	1	❒
バッファー	1	❒
反応停止液	1	❒
実験1からキュベットに入った比色標準液（S1～S5）	各1本	❒
DPTP	4	❒
15 mLコニカルチューブ	1	❒
キュベット	6	❒
マーカーペン	1	❒
DPTP洗浄用の脱イオン水または蒸留水の入ったビーカー	1	❒
ストップウォッチまたはタイマー	1	❒

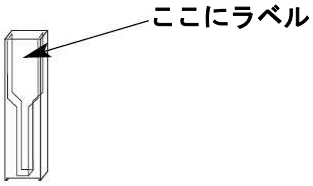
先生の実験台に用意するもの（任意）	数量	（✓）
分光光度計	1	❒

プロトコール

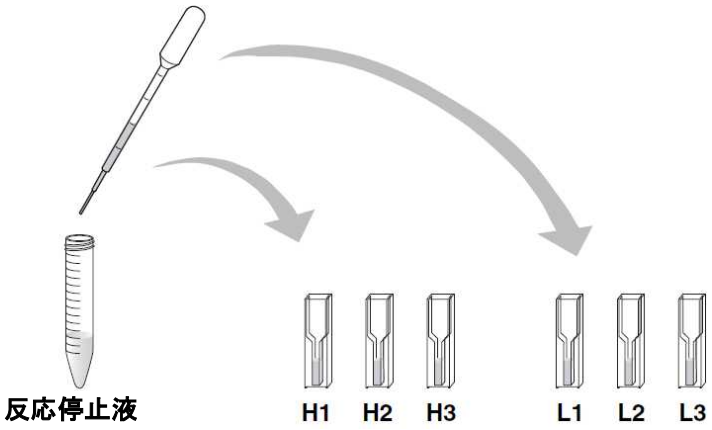
1. 15 mLコニカルチューブ1本に「低濃度酵素溶液」のラベルをつけます。新しいDPTPを使ってバッファー1 mLをチューブに移します。このDPTPを水で洗います。高濃度酵素溶液1 mLを「低濃度酵素溶液」のラベルのついたチューブに移し、混ぜます。このDPTPは水で十分に洗います。



2. キュベット3本に「H1～H3」（高酵素濃度の各時点）とラベルをつけ、残りのキュベット3本に「L1～L3」（低酵素濃度の各時点）のラベルをつけます。ラベルはキュベット前面の上部にのみつけます。



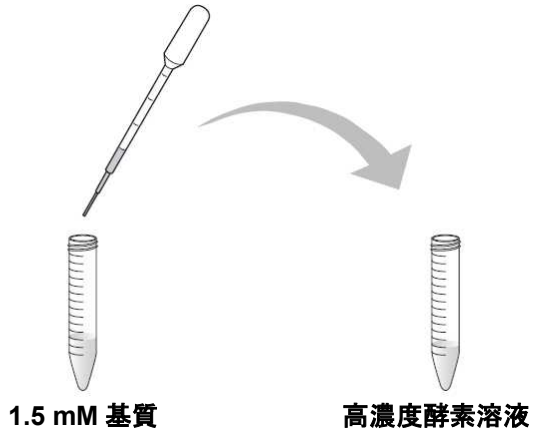
3. 新しいDPTPを使って反応停止液500 µLをそれぞれのキュベットに移します。このDPTPは水で十分に洗います。



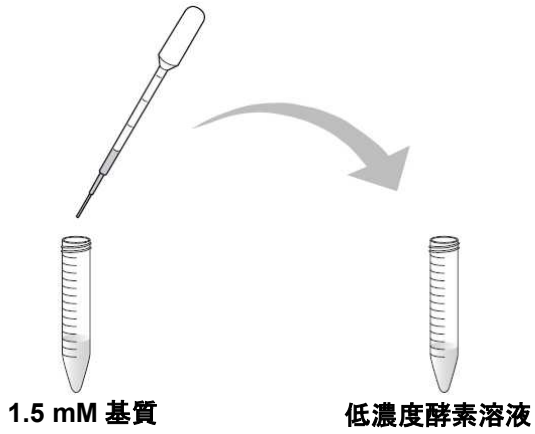
4. 新しいDPTP1本に高い酵素濃度を表す「H」とラベルし、別のDPTP1本に低い酵素濃度を表す「L」とラベルします。

5～7のステップは実験を進める前によく読んでおいてください。これらの手順にはタイムリミットがあります!

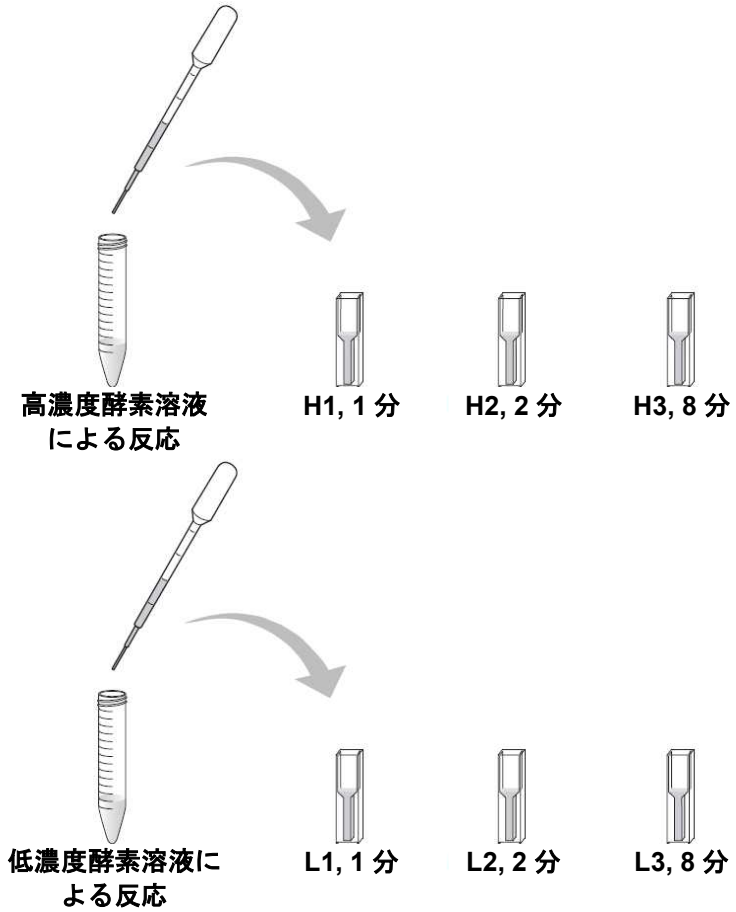
5. 「H」とラベルのついたDPTPを使い、1.5 mM基質250 µLを「高濃度酵素溶液」とラベルした酵素を含む15 mLコニカルチューブに移します。



6. 「L」とラベルのついたDPTPを使い、1.5 mM基質250 µLを「低濃度酵素溶液」とラベルした酵素を含む15 mLコニカルチューブに移します。**タイマーをスタートさせます。**



7. 下表に示す時点で、正しくラベルしたDPTPを使って「高濃度酵素溶液」および「低濃度酵素溶液」とラベルした15 mLコニカルチューブから溶液500 µLを取り出し、反応停止液の入っている該当のラベルのついたキュベットに加えます。



必ず、「H」とラベルしたDPTPは高酵素濃度反応チューブにのみ、「L」とラベルしたDPTPは低酵素濃度反応チューブにのみ使用してください。

時間	キュベット（高濃度酵素溶液）	キュベット（低濃度酵素溶液）
1分	H1	L1
2分	H2	L2
8分	H3	L3

8. DPTPを大量の水で洗い流し、後の実験にとっておきます。分析が終了した後、反応コニカルチューブ2本とキュベット6本を大量の水で洗い流し、後の実験にとっておきます。

注：未使用の原液や、標準液の入ったキュベットは捨てないでください。次の実験にも使用します。

様々な酵素濃度での生成量の定性分析

1. 「S1～S5」とラベルがついた標準液のキュベット5本を、実験台に用意します。「H1～H3」と「L1～L3」のキュベットのサンプルを用意し、それぞれのキュベットの色に一番合っている標準液の番号を確認します。各反応時点のサンプルに合った標準液の濃度を書き写します（表11から表12へ）。

表11. p-ニトロフェノール標準液

標準液	P-ニトロフェノール量（nmol*）
S1	0
S2	12.5
S3	25
S4	50
S5	100

*1 nmol = 1 ナノモル $= 1 \times 10^{-9}$ mol = 0.000000001 mol

表12. p-ニトロフェノール標準液に基づく、高／低酵素濃度で生成されたp-ニトロフェノールの測定

キュベット	最も近い標準液	生成P-ニトロフェノール量（nmol）
H1		
H2		
H3		
L1		
L2		
L3		

2. 分光光度計がない場合は、次をとばして「結果の分析」に進んでください。

様々な酵素濃度での生成量の定量分析

1. S1の標準液を410 nmで測定し、分光光度計のブランクとし、6本のキュベットの吸光度を測定します。吸光度を表13の2列目に記録します。

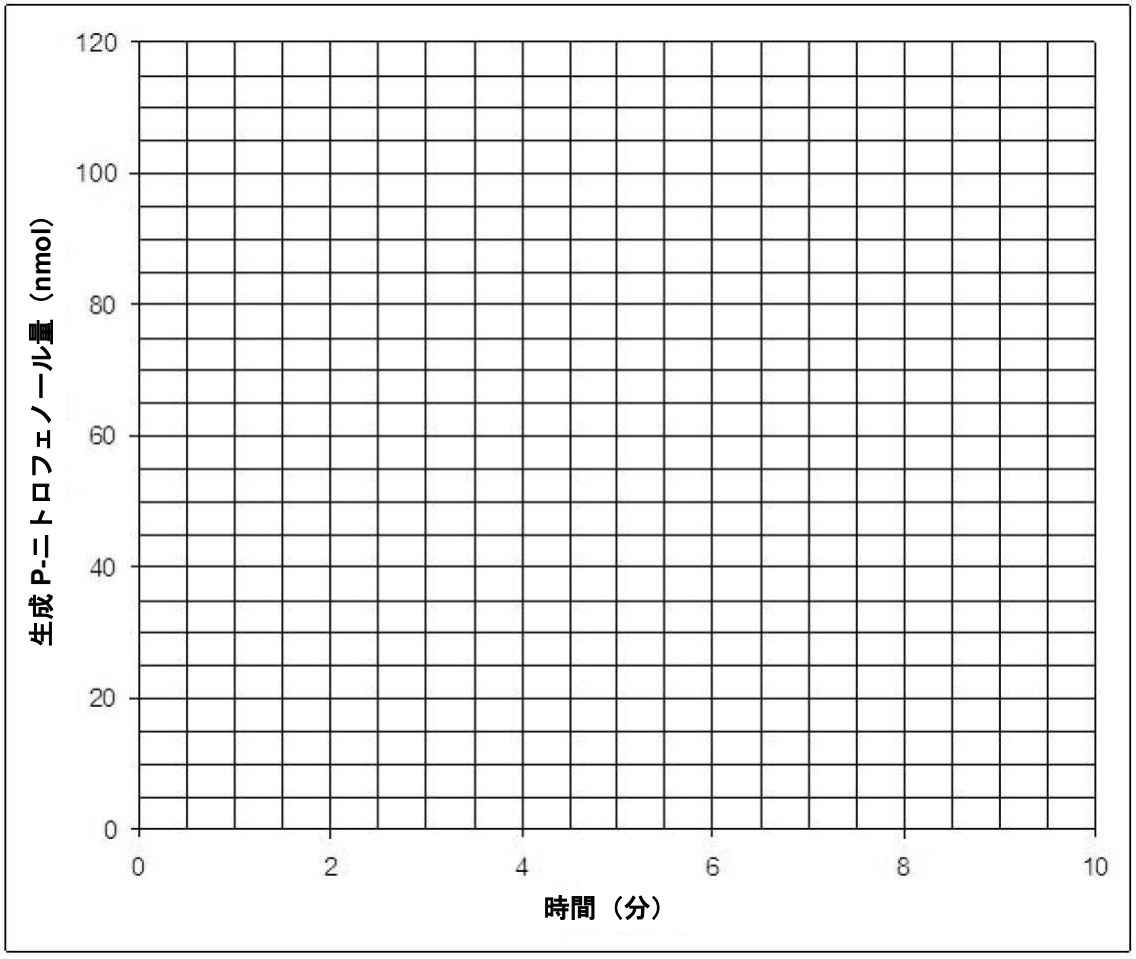
2. 実験1と同じプロトコールにしたがい、すべてのサンプルからp-ニトロフェノール量を計算し、この値を表13の3列目に記録します。

表13. 検量線に基づく高／低酵素濃度でのp-ニトロフェノール生成量の測定（図8と同様）

キュベット	410 nmでの吸光度	生成P-ニトロフェノール量（nmol）
H1		
H2		
H3		
L1		
L2		
L3		

結果の分析

1. 高濃度および低濃度酵素反応の両方について、時間に対する生成量を下の1つのグラフにプロットします。



2. 高濃度および低濃度酵素反応について初期反応速度を求めます。0分の生成量は0 nmolと推定されます。初期速度の計算には1分後の生成量を用います。

高酵素濃度の初期反応速度=1分後の生成量/1分=_____nmol/分

低酵素濃度の初期反応速度=1分後の生成量/1分=_____nmol/分

実験4：分析問題

1. 酵素量によって初期反応速度は変化しますか？それはなぜか、自分のデータを使って説明しなさい。

2. 最初の基質量が同じで、反応時間を十分にとった場合、酵素量によって最終生成量は変化しますか？

3. もしあなたが科学者で、糖からセルロースを製造する加水分解工程に使う酵素濃度を決定する責任者であったら、高濃度の酵素を使用するメリットは何だと思いますか？反対に、高濃度の酵素を使ったときのデメリットは何だと思いますか？

実験 5：反応速度に対する基質濃度の影響の決定

この実験では、初期反応速度に対する基質濃度変化の影響を調べます。基質濃度が初期反応速度と最終生成量に及ぼす影響を理解するためには、ここでも、森の中で木の実を集めるリスを考えるとよいでしょう。ここでは、リスが木の実を集める速さに対する木の実の数の影響、また長時間後にどの程度の木の実が集められるかを考えます。今回のシナリオでは、一定数の木が生えている小さな森で、同じ数のリスが木の実を集めているとしましょう。たくさんの木の実があるとき、初めのうちリスはすぐに木の実を見つけられますし、十分な時間のうちにはすべて集めることになるでしょう。一方で木の実の数が少ない場合は、同じ数のリスが木々を渡り木の実を探し当てるまでの時間が長くなり、十分な時間があっても最終的に集められる数は少なくなるでしょう。基質濃度が低い場合、これに似た影響が現れます。酵素は基質を見つける可能性が低くなりますから、初期反応速度は遅いはずで、十分な時間があっても、生成物に変換される基質が少なく、生成物の最終濃度は低くなると思われます。基質濃度を変化させたときの、より複雑な分析については、付録Aをご覧ください。

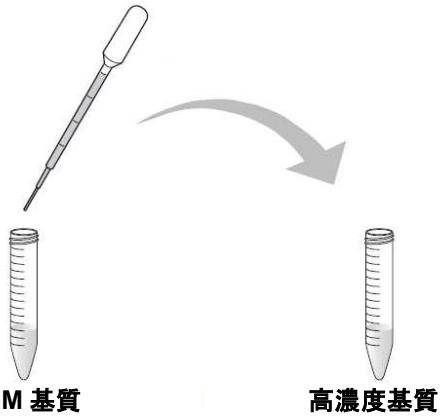
生徒の実験台に用意するもの	数量	(✓)
1.5 mM基質	1	❒
酵素	1	❒
バッファー	1	❒
反応停止液	1	❒
実験1からキュベットに入った比色標準液（S1～S5）	各1本	❒
15 mLコニカルチューブ	2	❒
DPTP	4	❒
キュベット	6	❒
マーカーペン	1	❒
DPTP洗浄用の脱イオン水または蒸留水の入ったビーカー	1	❒
ストップウォッチまたはタイマー	1	❒

先生の実験台に用意するもの（任意）	数量	(✓)
分光光度計	1	❒

プロトコール

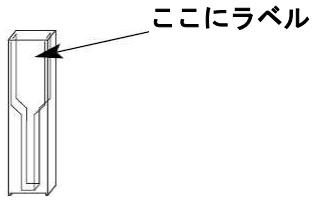
1. よく洗った15 mLコニカルチューブ1本に「低濃度基質」とラベルし、別の15 mLコニカルチューブ1本に「高濃度基質」とラベルします。

2. 新しいDPTPを使って1.5 mM基質1.5 mLを「高濃度基質」とラベルした15 mLコニカルチューブに移します。このDPTPをきれいな水で十分に洗い流します。

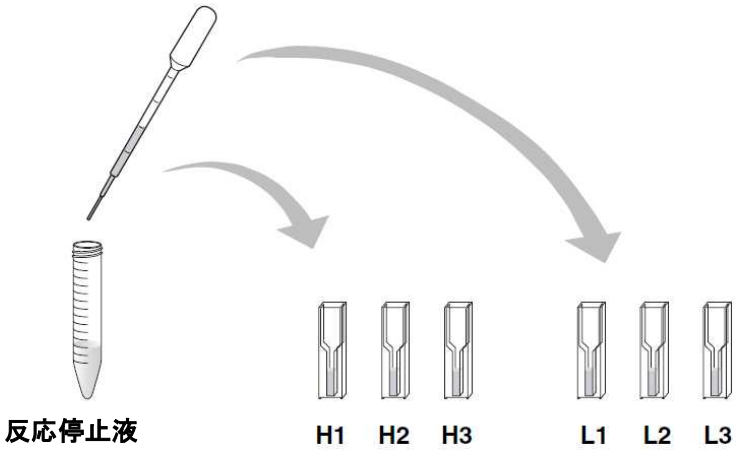


3. 新しいDPTPを使って、バッファー1.25 mLを「低濃度基質」とラベルした15 mLコニカルチューブに移します。このDPTPを水で十分に洗い流し、1.5 mM基質250 µLを「低濃度基質」とラベルした15 mLコニカルチューブに移し、混ぜます。このDPTPを水で十分に洗い流します。

4. キュベットに「H1～H3」（高基質濃度の各時点）と「L1～L3」（低基質濃度の各時点）のラベルをつけます。ラベルはキュベット前面の上部にのみつけます。



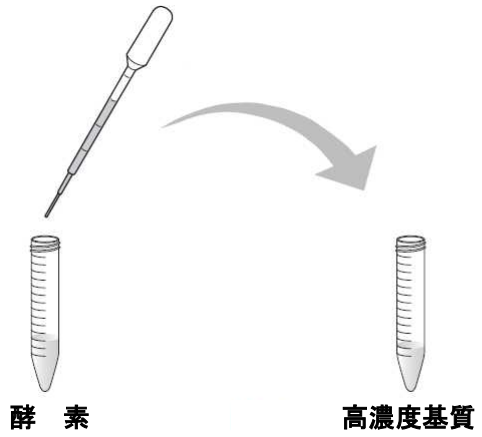
5. 新しいDPTPを使って反応停止液500 µLをそれぞれのキュベットに移します。このDPTPを水で十分に洗い流します。



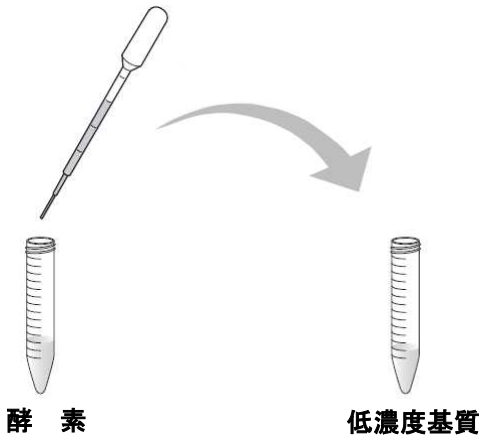
6. DPTP1本に高基質濃度を表す「H」とラベルし、別の1本に低基質濃度を表す「L」とラベルします。

7〜9のステップは実験を進める前によく読んで、理解しておいてください。これらの手順にはタイムリミットがあります!

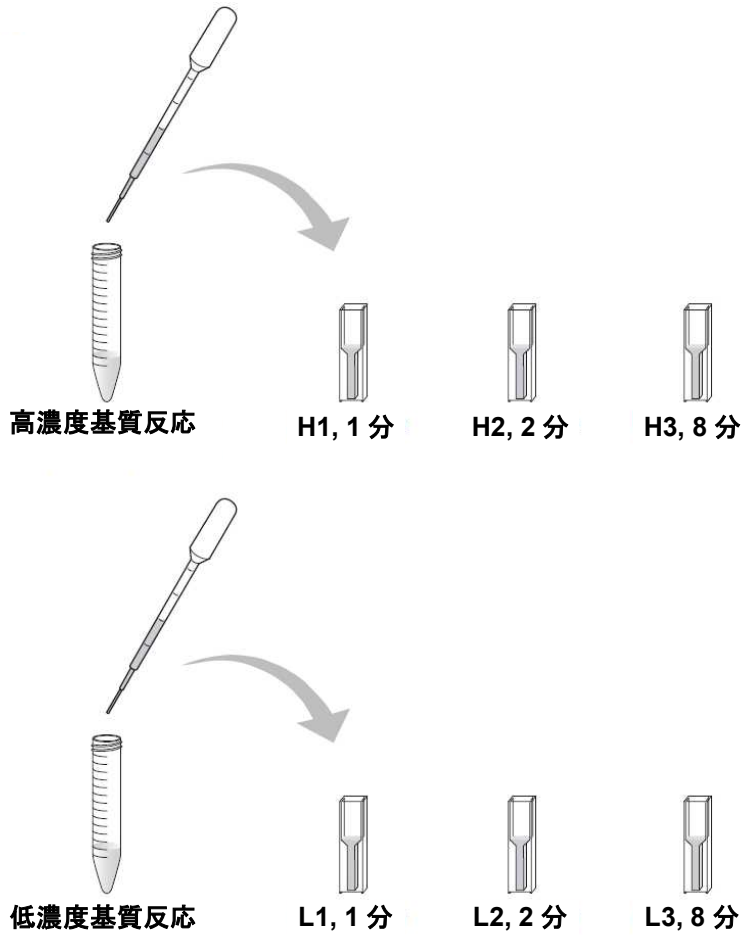
7. 新しいDPTPを使って、酵素750 µLを「高濃度基質」とラベルした15 mLコニカルチューブに移します。



8. 新しいDPTPを使って、酵素750 µLを「低濃度基質」とラベルした15 mLコニカルチューブに移します。タイマーをスタートさせます。



9. 下表に示す時点で、正しくラベルしたDPTPを使って「高濃度基質」および「低濃度基質」とラベルした15 mL遠心反応チューブから溶液500 µLを取り出し、反応停止液の入っている該当のラベルのついたキュベットに加えます。



必ず、「H」とラベルしたDPTPは高酵素濃度反応チューブにのみ、「L」とラベルしたDPTPは低酵素濃度反応チューブにのみ使用してください。

時間	キュベット（高濃度基質）	キュベット（低濃度基質）
1分	H1	L1
2分	H2	L2
8分	H3	L3

10. DPTPを大量の水で洗い流し、後の実験にとっておきます。分析が終了した後、反応コニカルチューブ2本とキュベット6本を大量の水で洗い流し、後の実験にとっておきます。

注：未使用の原液や、標準液の入ったキュベットは捨てないでください。次の実験にも使用します。

様々な基質濃度での生成量の定性分析

1. 「S1～S5」とラベルがついた標準液のキュベット5本を、実験台に用意します。「H1～H3」と「L1～L3」のキュベットのサンプルを用意し、それぞれのキュベットの色に一番合っている標準液を確認します。各反応時点のサンプルに合った標準液の濃度を書き写します（表14から表15へ）。

表14. p-ニトロフェノール標準液

標準液	P-ニトロフェノール量（nmol*）
S1	0
S2	12.5
S3	25
S4	50
S5	100

*1 nmol = 1 ナノモル $= 1 \times 10^{-9}$ mol = 0.000000001 mol

表15. p-ニトロフェノール標準液に基づく、高／低基質濃度で生成されたp-ニトロフェノールの測定

キュベット	最も近い標準液	生成P-ニトロフェノール量（nmol）
H1		
H2		
H3		
L1		
L2		
L3		

2. 分光光度計がない場合は、次をとばして「結果の分析」に進んでください。

様々な基質濃度での生成量の定量分析

1. S1の標準液を410 nmで測定し、分光光度計のブランクとします。6本のキュベットの吸光度を測定し、吸光度を表16の2列目に記録します。

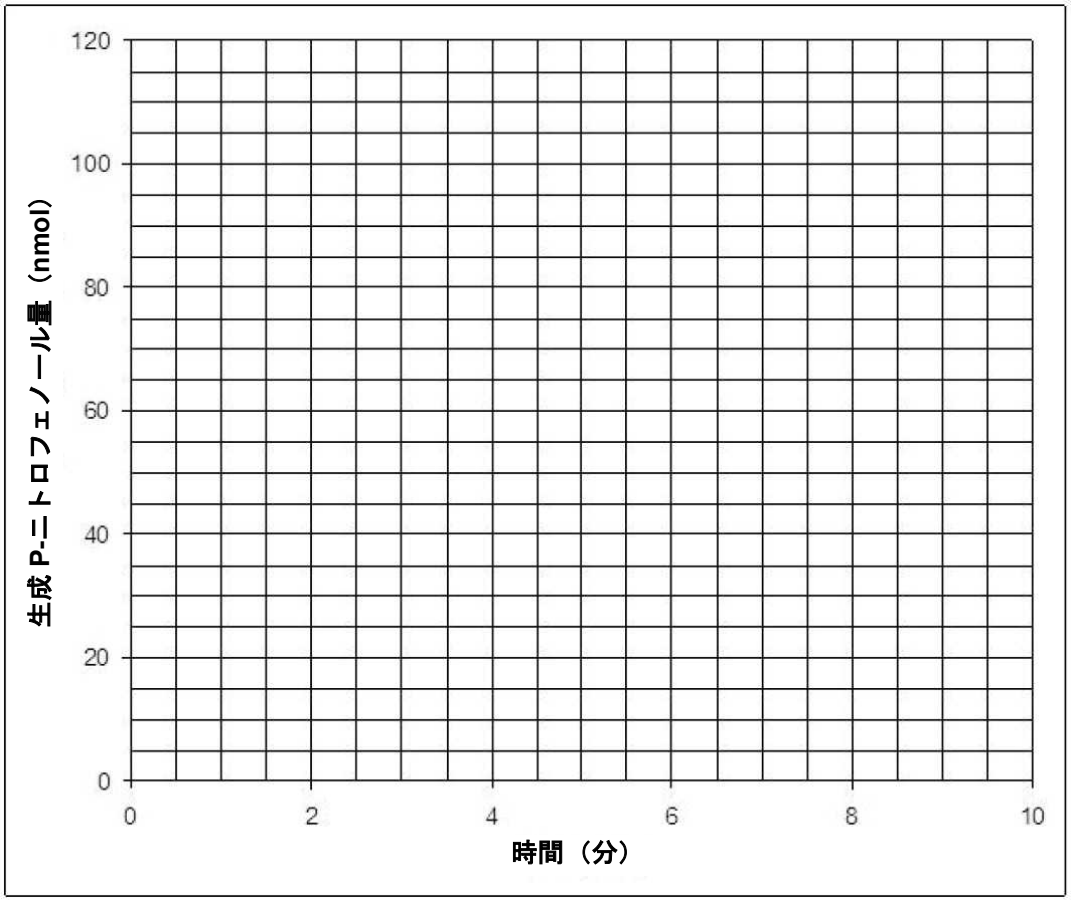
2. 実験1と同じプロトコールにしたがい、すべてのサンプルからp-ニトロフェノール量を計算し、この値を表16の3列目に記録します。

表16. 検量線に基づく高／低基質濃度でのp-ニトロフェノール生成量の測定（図8と同様）

キュベット	410 nmでの吸光度	生成P-ニトロフェノール量（nmol）
H1		
H2		
H3		
L1		
L2		
L3		

結果の分析

1. 高濃度および低濃度基質反応の両方について、時間に対する生成量を下の1つのグラフにプロットします。



2. 高濃度および低濃度基質反応について初期反応速度を求めます。0分の生成物濃度は0 nmolと推定されます。初期速度の計算には1分後の生成量を用います。

高基質濃度の初期反応速度=（1分後の生成量）/1分=_____nmol/分

低基質濃度の初期反応速度=（1分後の生成量）/1分=_____nmol/分

実験5：分析問題

1. 基質量によって初期反応速度はどのように変化しますか？

2. 基質濃度の変化が生成速度にどのように影響するか、類似例を挙げるか絵に描いて説明しなさい。

3. 反応時間を十分にとった場合、基質量によって最終生成量は変化しますか？

実験 6：キノコ抽出液の反応速度上昇能の検討

セロビオースの1,4 β-グルコシド結合を分解するセロビアーゼは、数多くの生物で産生されています。かび、酵母およびキノコといった菌類はこの酵素を産生して分泌することで、セロビオースを消化し、エネルギー源としてグルコースを生成しています。また多くの細菌にも、植物の細胞壁を分解するための細胞溶解酵素とセロビアーゼが含まれています。これらの細菌は、ウシなどの多くの有蹄類の第二胃（ルーメン）やシロアリの腸内にも認められます。さらにセロビアーゼは苦扁桃の種子にも認められ、エムルシンという名称でも知られています。実際にはエムルシンは、セロビアーゼと他の酵素が組み合わされたものと考えられています。この実験では、セロビアーゼを含むと思われるものを自分たちで選び、これからタンパク質を抽出し、この抽出液と基質（p-ニトロフェニル・グルコピラノシド）を使って、自身の抽出液が基質を分解する酵素活性をもっているかを調べます。

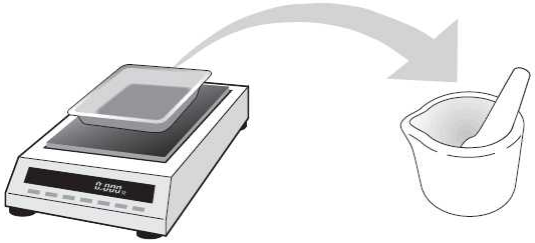
生徒の実験台に用意するもの	**数量**	**（✓）**
キノコサンプル	1	❒
1.5 mM基質	1	❒
反応停止液	1	❒
1x 抽出用バッファー	1	❒
15 mLコニカルチューブ	1	❒
1.5 mLマイクロチューブ	1	❒
DPTP	4	❒
キュベット	6	❒
マーカーペン	1	❒
乳鉢と乳棒	1	❒
ろ紙、こし布またはこし器	1	❒
DPTP洗浄用の脱イオン水または蒸留水の入ったビーカー	1	❒
ストップウォッチまたはタイマー	1	❒

先生の実験台に用意するもの（任意）	**数量**	**（✓）**
分光光度計	1	❒

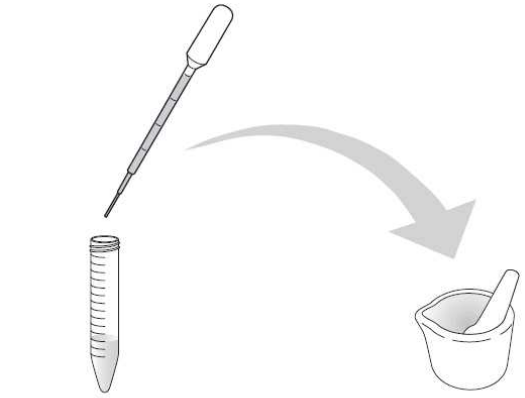
プロトコール

1. 使うキノコの名称を書きます _____

2. キノコ約1グラムを量り、乳鉢に入れます。 _____ g

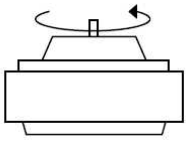


3. キノコ1グラムあたり抽出用バッファー2 mLを乳鉢に加えます。 _____ mL



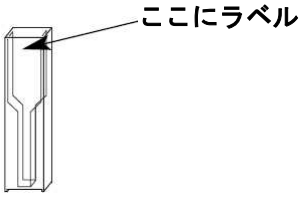
4. 乳棒を使ってキノコをすり、懸濁液状にします。

5. ろ紙またはこし布を使ってこの懸濁液の固体粒子をこして、ろ液を1.5 mLマイクロチューブに入れます。もしくは遠心した場合は、懸濁液を1.5 mLマイクロチューブにすくい入れ、最高速度で2分間遠心して固体粒子を沈殿させます。

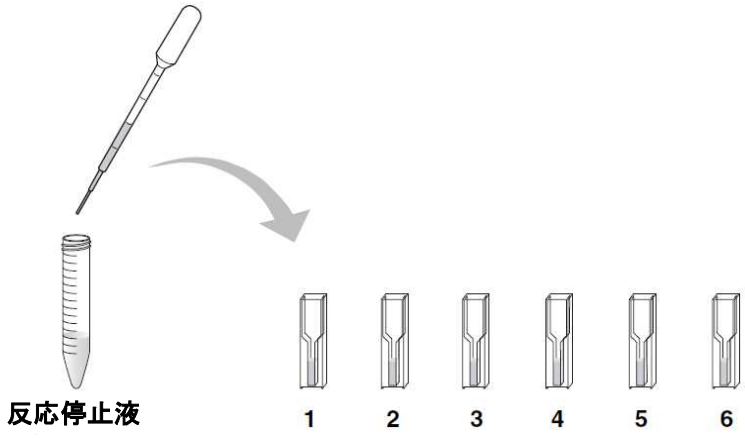


注：酵素反応を行うためには250 µL以上の抽出液が必要です。

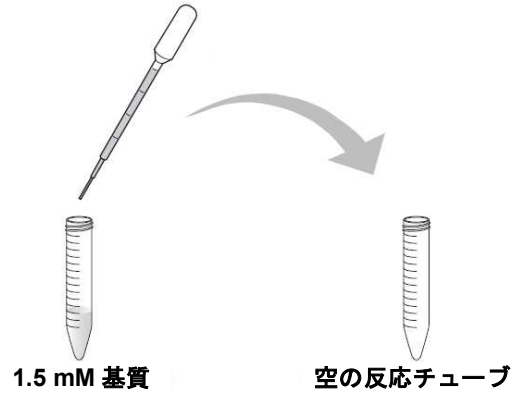
6. キュベットに「1～6」のラベルをつけます。ラベルはキュベット前面の上部にのみつけます。



7. 新しいDPTPを使って反応停止液500 µLをそれぞれのキュベットに移します。このDPTPは水で十分に洗い流します。

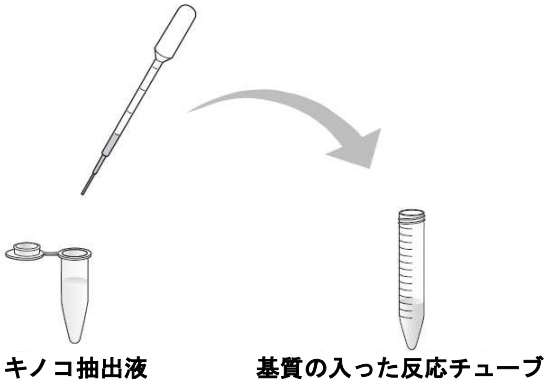


8. 15 mLコニカルチューブ1本に使うキノコの種類を書いたラベルを貼ります。新しいDPTPを使って基質3 mLをこのチューブに移します。

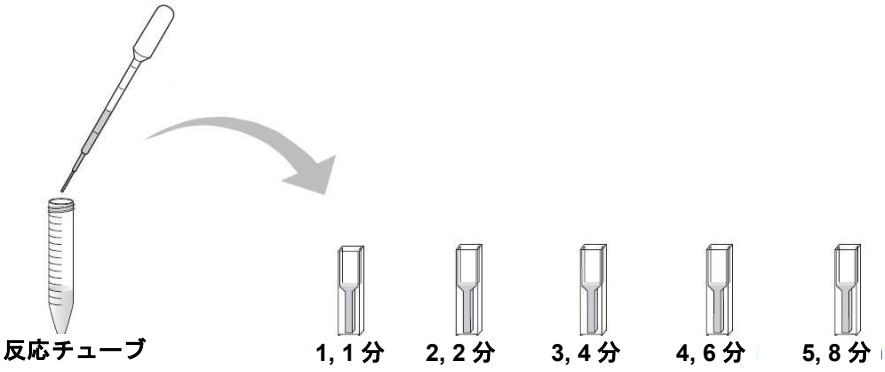


10〜11のステップは実験を進める前によく読んで、理解しておいてください。これらの手順にはタイムリミットがあります!

9. 新しいDPTPを使って、キノコ抽出液250 µLを基質3 mLの入った15 mLコニカルチューブに移します。**タイマーをスタートさせます。**

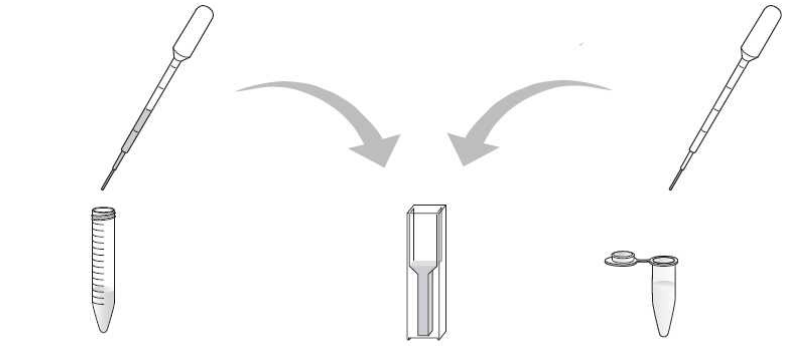


10. 下表に示す時点で、15 mLコニカルチューブからキノコ抽出液と基質の混液500 µLを取り出し、反応停止液の入っている該当のラベルのついたキュベットに加えます。



時間	キュベット
1分	1
2分	2
4分	3
6分	4
8分	5

11. 新しいDPTPを使って抽出用バッファー500 μLをキュベット#6に移します。このDPTPを洗い、さらにキノコ抽出液1滴を加えます。この溶液が今回の実験の「ブランク」となります。



12. DPTPを大量の水で洗い流し、後の実験にとっておきます。分析が終了した後、反応コニカルチューブおよびキュベットを大量の水で洗い流し、後の実験にとっておきます。

注：未使用の原液や、標準液の入ったキュベットは捨てないでください。次の実験にも使用します。

様々な基質濃度での生成量の定量分析

1. ブランク（キュベット#6）を410 nmで測定し、分光光度計のブランクとします。5本のキュベットの吸光度を測定し、吸光度を表17の2列目に記録します。

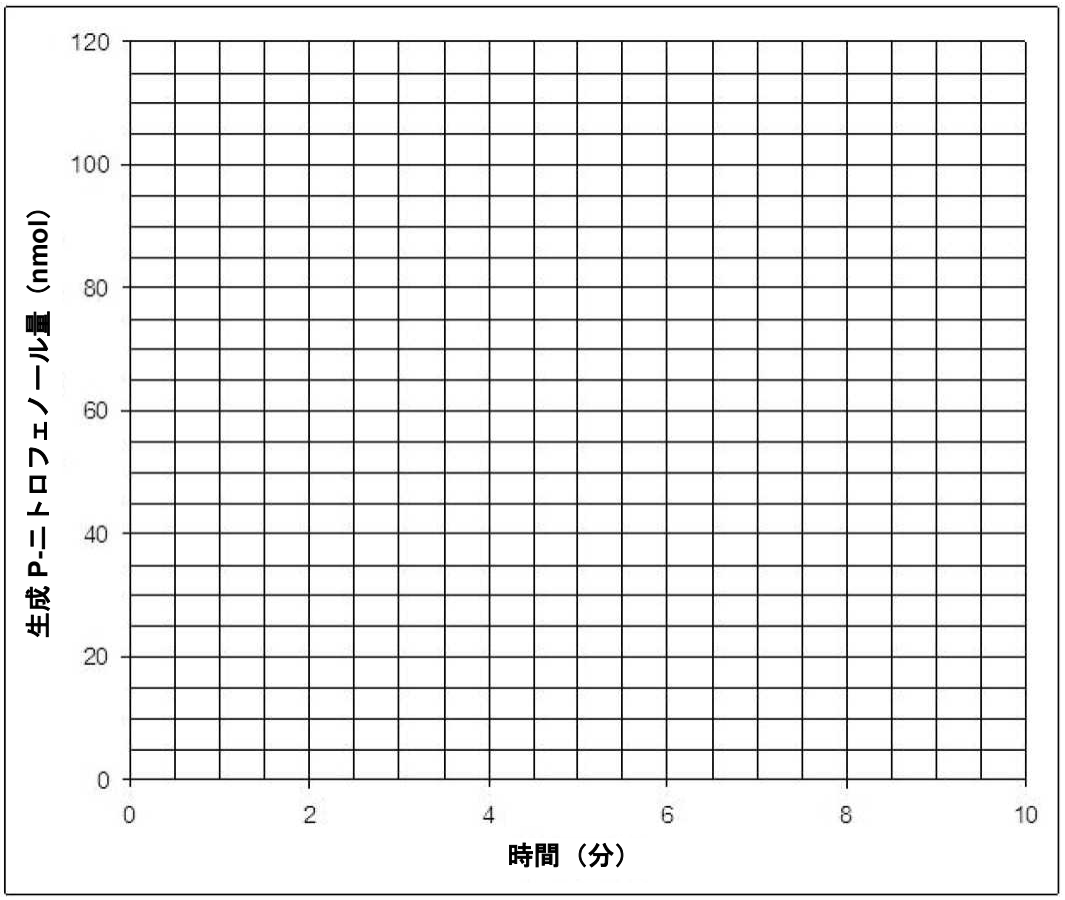
2. 実験1と同じプロトコールにしたがい、すべてのサンプルからp-ニトロフェノール量を求め、この値を表17の3列目に記録します。

表17. キノコ抽出液による基質分解で生成したp-ニトロフェノール量の、検量線に基づく測定（図8と同様）

キュベット	410 nmでの吸光度	生成P-ニトロフェノール量（nmol）
1		
2		
3		
4		
5		
6	0.00	

結果の分析

1. キノコ抽出液による、時間に対する生成量を以下のグラフにプロットします。



2. キノコ抽出液に関する初期反応速度を求めます。

初期反応速度= _____ nmol/分

実験6：分析問題

1. 自分たちのキノコ抽出液は基質を分解しましたか（つまり、黄色の生成物が得られましたか）？

2. これまでの実験と異なるブランクを使ったのはなぜですか？ヒント：キノコが本来黄色であったら、吸光度の読取り値にどのような影響があったでしょう？

3. 自分たちのキノコ抽出液の初期反応速度と、このキットに含まれている酵素のそれを比較しなさい。これまでpH、温度および酵素濃度の影響について学習しましたが、それらから、今回の酵素抽出液が初期反応速度に影響しただろういくつかの要素を説明できますか？

4. 科学者たちは、工業用の工程に使用することができる酵素源を常に探しています。あなた自身が、バイオ燃料用のエタノール生成にセロビアーゼ源を選ぶ場合、酵素源としてどのような種類の生物を探しますか？ヒント：バイオ燃料の製造においてエタノールに変換されるグルコースを生産するためには、高温かつ低pHで反応が生じる必要があります。

付録 A
酵素キネティクス

基質濃度の変化によって酵素反応速度はどのように変化するか

もし皆さんがセルロース系エタノール工場に関わっていたとしたら、皆さんが使っている酵素が、その仕事に利用できる酵素の中で最も効率的なものか確認したいと考えることでしょう。1つの酵素の働きを他のものと比較するためには、一定条件下で様々な酵素の酵素活性を比較したいと思うのではないでしょうか？酵素活性（すなわち、1つの酵素が反応をどの程度触媒するかということ）は、最大反応速度（V_{max}）と、基質が生成物に変換される効率を示したミカエリス定数（K_m）と呼ばれる2番目の項から表すことができます。

酵素は、その活性部位が基質で完全に飽和されたときに、その最大速度（V_{max}すなわち最大反応速度とも呼ばれる）で働くことができます。このようなことは、基質濃度が極度に高く、酵素と基質の結合の時間の遅れが無視できるほど短いときに生じます。しかし、酵素の最大反応速度は実験的に測定することはできません。というのも、あらゆる酵素分子のあらゆる活性部位に基質が一定に利用できるようなときにのみ、これが生じるからです。現実的には、酵素が溶液中のその基質と結合するためには必ず、若干の時間の遅れが必要になります。

実験的に求めることができるパラメーターは初期反応速度で、実験5と同様、様々な開始時基質濃度を使用して測定することができます。基質濃度に対する初期反応速度をプロットしたとすれば、図12と同様のグラフが得られることになります。

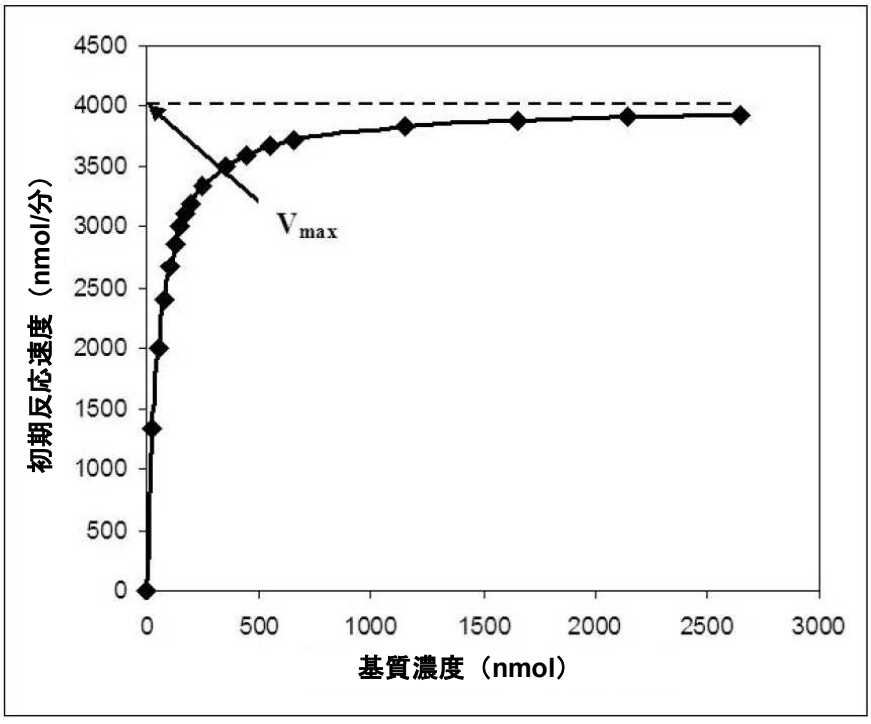


図12.　酵素の初期反応速度と、反応開始時に加えた基質濃度との相関。

極度に高い基質濃度でV_{max}に近づくが、決してこれに到達することはない。

実験的にV_{max}を求めることはできないため、その代わり、実験的に求められるもしくは実験的にコントロールできる因子、すなわち初期反応速度（V_O）および開始時基質濃度[S]と、V_{max}との数学的関係を求めることが有用です。最大反応速度（V_{max}）、初期反応速度（V_O）、基質濃度（[S]）、およびその酵素基質系に特異的な定数項（K_m）との関係を示したものが、下に示すミカエリス・メンテンの式です。

1式：
$$V_o = \frac{V_{max} * [S]}{(K_m + [S])}$$

ここで

V_O = 規定の開始時基質濃度における初期反応速度

V_{max} = 最大反応速度

[S] = 基質濃度

K_m = 各酵素基質系に特定のミカエリス定数（以下の微分式参照）

ミカエリス定数（K_m）は、酵素機能を示すもう1つのパラメーターです。反応がその最大速度の半分の速さで進むときの基質濃度に相当します。初期反応速度（V_O）がその最大速度の半分に等しい場合、ミカエリス・メンテンの式に当てはめると以下のようになります。

2式：
$$\tfrac{1}{2}V_{max} = \frac{V_{max} * [S]}{([K_m + [S])}$$

$V_O = 1/2V_{max}$のときK_mについて解くとK_m=[S]となります。つまりこのミカエリス定数は、初期反応速度が最大反応速度の半分になるような基質濃度に等しい、ということです。

ミカエリス・メンテンの式を導く

では、このミカエリス・メンテンの式はどのように求められたのでしょうか？実際に起きている反応では、K_mはどのような意味をもつのでしょうか？K_mは、酵素反応にかかわる速度定数という観点からも理解することができます。酵素（E）が基質（S）に加えられると、酵素基質複合体（ES）が形成されます。この複合体の形成に関する平衡定数は、（k_1）と記述されます。この酵素基質複合体からk_2という速度定数で生成物（P）が形成され、酵素（E）が遊離することがあります。もしくは、基質が生成物に変換されず、k_{-1}という速度定数でES複合体が離れることもあります。

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\leftrightarrow}} ES \xrightarrow{k_2} E + P$$

生成物が形成される速度は、酵素基質複合体[ES]の濃度によって決定されます。過剰量の基質が存在する場合、[ES]は遊離酵素[E]の濃度よりはるかに高いものです。このときが、反応速度がV_{max}となっているときです。

定常（平衡）状態では、酵素基質複合体の形成速度はその分解速度と等しくなっています。反応速度は（平衡定数）×（反応物質濃度）で表されますから、次のようにも言えます

3式： $k_1[E][S] = k_{-1}[ES] + k_2[ES]$

この式は代数的に、式の右側を[ES]でくくり、両側を$k_{-1}+k_2$で割って、以下のように直すことができます。

4式： $$[ES] = \frac{k_1[E][S]}{k_{-1} + k_2}$$

どの時点でも、基質に結合した酵素の割合（F）は、以下の式で示すことができます。

5式： $$F = \frac{[ES]}{([ES] + [E])}$$

そして、もし代数的に4式と5式とを結合させると（簡単な代数ではありませんが）

6式： $$F = \frac{[S]}{\{(k_{-1} + k_2)/ k_1\} + [S]}$$

となります。基質に結合している酵素の割合は、以下の式で表すことができますから

7式： $V_o = V_{max} * F$

もう一度置換して、

8式： $$V_o = \frac{V_{max} * [S]}{\{(k_{-1} + k_2)/ k_1\} + [S]}$$

ここで8式とミカエリス・メンテンの式（1式）を比べてみてください。 $$V_o = \frac{V_{max} * [S]}{(K_m + [S])}$$

このようにK_mは、反応の速度定数という点から規定されます。ここで、実際に起きている反応という点からK_mが規定されました。

9式： $K_m = (k_{-1} + k_2)/k_1$

線形プロットの作成

もういちど、酵素を他と比較できるよう、私達の酵素についてV_{max}とK_mを求めましょう。図12では双曲線になっているため、V_{max}を実際に求めることは困難です。その問題を解決するには、Y値（初期速度）とX値（基質濃度）双方の逆数をとることが一番です。これにより、「Lineweaver-Burkプロット」または二重逆数プロットと呼ばれる線形のグラフが得られます（図13）。

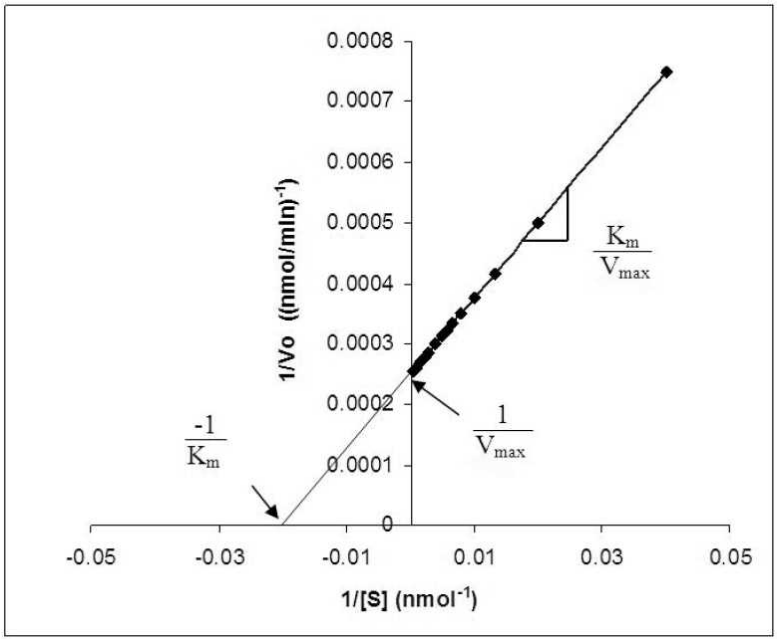


図13. 「Lineweaver-Burkプロット」
ミカエリス定数 K_m と最大反応速度 V_{max} を求めるため、反応速度データを線形にしたものを用いる。

データを線形にすることにはメリットがあります。すなわち、自身のデータがどれほど優れているか（線形回帰計算によりどれほど直線に近づいているか）が分かるだけでなく、X切片とY切片の逆数を考えることでV_{max}とK_mを正確に求めることができます。このキットの内容と実験5に類似したプロトコールを利用することで、キットに提供されているセロビアーゼのV_{max}とK_mを求めることが可能です。

付録 B
バイオ燃料

バイオ燃料の種類

化石燃料はずっと以前に死んだ生物から作られる燃料であるのに対し、「バイオ燃料」という言葉を使うとき、通常は、少し前まで生きていた生物から生成される燃料群を指します。最新のバイオ燃料技術は、以下の4つのカテゴリに大きく分けられる傾向があります。すなわちセルロース系エタノール、糖やでんぷんから製造されるエタノール、合成ガスおよびバイオディーゼルです。セルロース系エタノールは主に、セルロースをグルコースに分解し、さらに発酵段階を経てエタノールを生成します。もうひとつのエタノール生成法は、でんぷんを糖に分解し、さらに発酵させてエタノールを生成する方法です。バイオディーゼルはオイルに由来する燃料で、リサイクルされた食用油や、高レベルのオイルを生成する植物から直接生成されることもあり、これはさらに精製されてディーゼルエンジンで燃焼されます。藻類、酵母、細菌を遺伝子組み換えし、脂肪酸や、バイオディーゼルオイルとして使用できるオイルを生成する試みも行われています。合成ガス（Syngas、すなわちsynthetic gas）はバイオマスを燃焼して得られる、一酸化炭素と水素ガスの混合物です。合成ガスは発電用に直接燃焼することもできますし、化学的に変換して改良ディーゼルエンジンで使用することもできます。ここからは、主にセルロース系エタノールについて説明しますが、でんぷんベースのエタノール生成、合成ガスおよびバイオディーゼルについての詳しい参考資料を付録Hに示しています。

第一世代の燃料用エタノール生成

現在、燃料産業で使用されているエタノールの大半は（トウモロコシの粒などの）でんぷんから糖に変換され、発酵によりエタノールにされたものです。でんぷんから糖に変換にすることについては、2つの大きな短所があります。第一に、人や家畜から食物を奪ってしまうこと。第二に、エタノールに変換される多糖類は、トウモロコシの粒のみに含まれるでんぷんであるため、トウモロコシの大半部分は無駄になってしまう、ということです。食用植物で廃棄される部分や、食料や飼料としては使用されない植物を燃料に換えることができれば、より持続的に燃料を生産する方法となります。このため、燃料源としてのエタノール生成に関する研究は、現在、でんぷんよりもセルロースを利用することに集中しています。とはいえ、セルロースからエタノールを生成する技術は、でんぷんから生成する技術よりはるかに複雑です。付録Fに、バイオ燃料の将来を考えるのに役立つ議論の骨組みを示しています

セルロース系エタノールのバイオ燃料は、石油に代わるカーボンニュートラルなエネルギーとなるか？

植物は、空気中の二酸化炭素をその細胞壁のセルロースに変換しています。セルロースが糖に分解され、燃料に変換され、後に燃焼されて二酸化炭素になるとすると、このプロセスのために生物圏に二酸化炭素が増えたり減ったりすることはありません。これは「カーボンニュートラル」なプロセスと呼ばれます。しかし、トウモロコシの茎、皮、葉、または非食用部分をエタノールに換えるためには、若干の石油が必要です。作物の栽培に使用する肥料、栽培と収穫に使うトラクターやその他の農業機械、植物からエタノールの生産工程に必要なエネルギーなどは現在、直接的または間接的に石油を必要としています。専門家の計算では、セルロースからエタノール5ガロン（約19リットル）を生産するためには、1ガロン（約3.8リットル）が必要ということです（Montenegro 2006）。

化石燃料を燃やすことはカーボンニュートラルとはいえません。この炭素は数百年前の二酸化炭素から固定されたものです。化石燃料に含まれるすべての炭素は基本的に、自然の炭素循環から締め出されたものです（Martin 2008）。化石燃料の燃焼によって炭素循環に二酸化炭素が加えられ、これにより温室効果ガスの量が増え、現在の地球温暖化の危機を招いています（図13）。世界で使用する石油の量が減り、植物から生産される材料が継続的に利用されるようになれば、温室効果ガスの放出が抑えられるかもしれません。

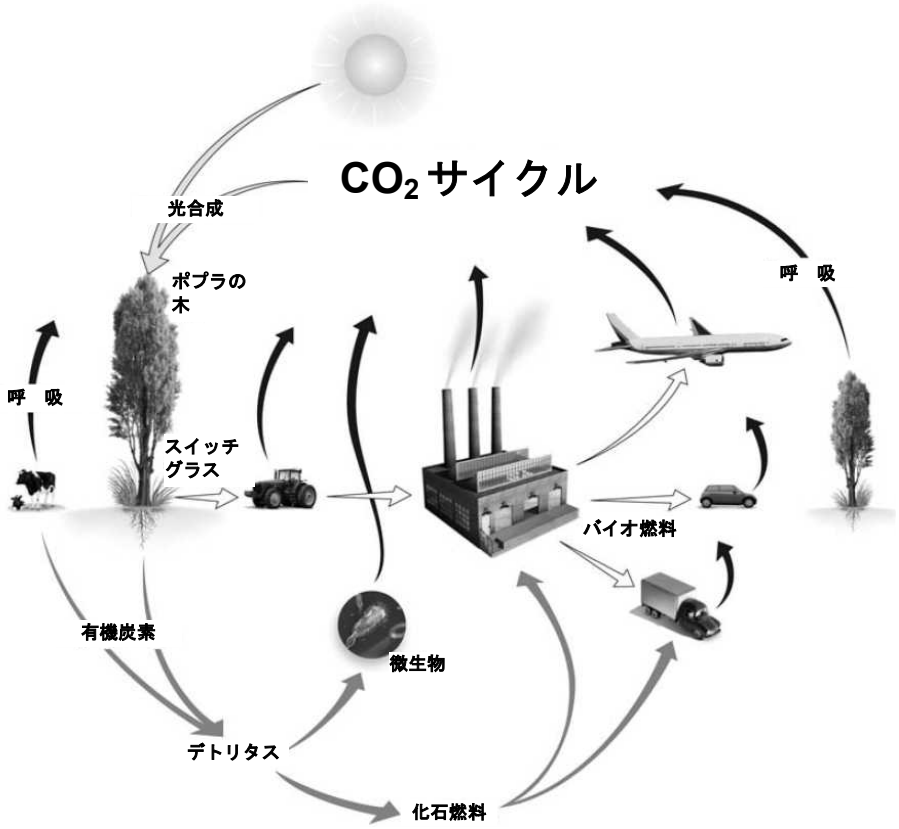


図13.　バイオ燃料の生産と使用を含めた炭素循環
植物は大気中から二酸化炭素を取り出し、日光のもとでこれをセルロースなど複雑な多糖類に変換することができます。スイッチグラスやポプラの木などの植物は収穫後、セルロース系エタノール工場で飛行機や自動車、トラックなどの燃料用エタノールに加工されます。しかしスイッチグラス、木、植物の加工に使用されるトラクターや乗り物、またセルロース系エタノールで走る乗り物はまだ、二酸化炭素を放出します。二酸化炭素はこの他、動物の呼吸、化石燃料の燃焼、微生物による有機物質の分解などによっても生じます。バイオ燃料の生産と加工により生じる二酸化炭素は、セルロース系エタノールで使用する植物によって再吸収されることが理想的です。化石燃料を使用する場合はそうではありません。化石燃料は二酸化炭素の生成にのみ貢献するからです。

光合成が効率的なC4植物

バイオ燃料作物と考えられる植物の多くはC4食物です。トウモロコシ、サトウキビまたスイッチグラス（野原の草）といったこれらの植物は、驚くほどの効率性で光合成をします。つまり、他の植物よりはるかに速く糖を生成しています。これにより他の植物に比べ生長も速く、糖を取り込んでセルロースを生成する速度も速くなっています。

窒素について

持続的で、かつ生物圏に対して有益になるように窒素循環を維持することも、非常に重要です。作物がセルロース系エタノール製造のために収穫される場合、窒素は土壌から作物内の生体分子となり、土壌から消失することになります。この損失分を無機肥料を使って補充するのであれば、これには2つの欠点があります。第一に、無機肥料の製造には燃料が必要です。第二に、窒素をベースとする温室効果ガス（すなわち亜酸化窒素）は、炭素をベースとする温室効果ガスに比べて300倍近く強力だということです。肥料から生じたこのような窒素ベースガスが、土壌から放出されてしまいます（Smith 2009）。このような問題は、排水や肥料としてセルロース系燃料となる植物のバイオマスを利用すること（つまり土壌に窒素を戻すこと）や、あるいは被覆作物としてアルファルファなど窒素固定作物を利用することで解決されるかもしれません。アルファルファは畜牛の牧草として日常的に栽培されているもので、その根に生育する細菌との共生関係によって空気中から窒素を固定できるという、他の草より優れた性質を持っています。アルファルファは空気中の窒素を利用しますから、窒素ベースの肥料は不要です。将来的には、バイオ燃料の利用を通して炭素と窒素を再循環できるかもしれません。

加水分解酵素の作製

セルロースからエタノールを製造するために必要な工程は、理想的には、少量のエネルギーと低いコストで多量のエタノールを製造するよう最適化されるべきです。セルロース分解に使用される酵素の効率性を改善するため、多くの取り組みが行われています。植物原料から糖を生成する工程には高温や極度のpHが必要であるため、セルロース系エタノールの生成に関わる酵素は、そのような条件下で機能できるものである必要があります。科学者たちは様々な方法を使って、このような極限条件下で効率的に働く酵素を作製することができます。その1つは、同様の条件下で生存して目的の酵素を生成している細菌や菌類などの微生物を見つけ出す方法です。温泉、酸性の沼地、アルカリ性のソーダ湖（Tiago et al. 2004）は、それぞれ高温、低pHまたは高pHといった条件で機能する酵素を生成する微生物を見つける格好の場所です。もう1つの方法は、紫外線や化学物質を使って微生物を突然変異させ、目的の特徴をもつ酵素を生成するものを選ぶ、というものです。また、目的のセルラーゼ酵素をコードする遺伝子をクローニングし、対象となる遺伝子のみを突然変異させ、「エラープローンPCR法」と呼ばれる技術でコピーすることもできます。これにより、プラスミドにライゲーションし、細菌に形質転換できる変異体が作製されます。このように形質転換された細菌をスクリーニングすることで、目的の条件で働くセルラーゼを得ることができます（Arnold and Georgiou 2003）。

微生物発酵

酵素処理したセルロースからグルコースを生成したら次は、これを燃料に加工する必要があります。グルコースから製造される最も一般的な燃料は、エタノールです。酵母はアルコール発酵と呼ばれるプロセスにより、非常に効率的に糖をエタノールに変換させます。Zymomonas mobilisやEscherichia coli（大腸菌）などの細菌が、グルコースからエタノールを効率的に生成できるよう遺伝子組換えされています。植物の一次処理後にセルロースからヘミセルロースが分離されない場合、キシロースやアラビノースといった五糖類がヘミセルロースから生成される可能性があります。その場合、これら五糖類に関する酵素経路をもつ微生物が、それをエタノールに変換するために利用されます。植物の分解により生成されるすべての糖を代謝できる酵母株も、バイオエンジニアリングにより作製されています。

燃料としてのエタノールの実用性

乗り物は85～100%のエタノールで走行できます。ブラジルではほとんどの市バスがエタノールのみを利用しています。従来のガソリン使用車の多くは、85%エタノールと石油の混合燃料（E85）の使用に変えることができます。

付録 C
Bio-Rad SmartSpec™ Plus スペクトロフォトメーターの設定

SmartSpec Plusスペクトロフォロメーターは簡単、かつ直感的に操作することができます。簡単な説明を以下に述べます。詳しくはSmartSpec Plus分光光度計取扱い説明書をご覧ください。文中、枠内はSmartSpec Plusスペクトロフォトメーターのデータ画面です。また、正しく読取るためには、キュベットを正しい方向に差し込んでください。

1. SmartSpec Plusスペクトロフォトメーターの電源を入れ、「λ」キーを押します。

Enter number (1–3) of wavelengths to read: 1

   「**1**」と入力し、「**Enter**」を押します。

2. 波長を選択します。

Enter wavelength: _____nm

   「**410**」と入力し、「**Enter**」を押します。

3. バックグランドを設定します。

Do you want to substract background reading? NO

   「***NO***」を選択し「**Enter**」を押します。

4. S1（0 nmol p-ニトロフェノール）標準液を入れたキュベットを、光路に平らな面が向かい合うようにチャンバー内におきます。

Read to read absorbance <=Exit Assay >= Options

   「**Read Blank（ブランク測定）**」を押します。

A410=0.00 >=continue

   矢印「▶」を押して、測定を続けます。

5. S1標準液の入ったキュベットを取り出し、S2標準液のキュベットを光路に平らな面が向かい合うようにチャンバー内におきます。

A410=0.250 Samp #1

「**Read Sample（サンプル測定）**」を押します。

このA410は作製した標準液によって異なります。複数サンプルを読み取った場合、サンプル#はこれを反映したものになります。

A410値を記録します。この吸光度は25 nmol p-ニトロフェノールに相当します。

6. チャンバーからS2標準液のキュベットを取り出し、ステップ5にしたがって残りの標準液（S3～S5）を読取ります。

標準液	410 nmでの吸光度	濃度（nmol/mL）
S1	0.000	0
S2		25
S3		50
S4		100
S5		200

付録 E
用語集

β-グルコシダーゼ： セロビオースの2つのグルコース分子をつなぐβ 1–4結合を分解する酵素。B 1–4結合グルコースの短い重合鎖も分解する。これらの酵素は立体特異的で、つまりα 1–4結合を分解することはできない。

セロビアーゼ： セロビオースの2つのグルコース分子をつなぐβ 1–4結合を特異的に分解するβ-グルコシダーゼ酵素。

セロビオース： β 1–4結合で共有結合した2つのグルコース分子からなる分子。

セルロース： β 1–4結合したD-グルコースの複数鎖からなるポリマー。セルロースの長鎖に分枝はなく、この鎖は硬くて長いロッド状になっている。長いセルロース鎖を構成するこれらのグルコース分子は、水素結合して長い繊維を形成することがある。セルロースは（ヘミセルロースおよびリグニンとともに）植物の細胞壁の主成分の1つである。

エンドセルラーゼ： セルロース分子内部のβ 1–4結合を分解する酵素ファミリー（反対にエクソセルラーゼは、ポリマー鎖末端でセルロース結合を分解する酵素ファミリー）。この酵素ファミリーの一般名はセルラーザである。別名については以下参照：http：//www.expasy.org/enzyme/3.2.1.4

酵素： 反応の活性化エネルギーを下げて反応速度を上げる生物分子（通常はタンパク質だが、核酸の場合もある）。これ自体は反応で消費されることはない。
エクソセルラーゼ：セルロース重合鎖の還元末端（セロビオヒドロラーゼIファミリー）および非還元末端（セロビオヒドロラーゼIIファミリー）からセロビオースを切断して放出させる酵素ファミリー。この酵素ファミリーの一般名はセルロース1,4-β-セロビオシダーゼである。別名については以下参照：http：//www.expasy.org/enzyme/3.2.1.91

ヘミセルロース： 五糖類および六糖類の鎖からなるポリマー。ヘミセルロースは結晶構造を持たないが、そのかわり植物の細胞壁内で非晶鎖から成っている。セルロースは直鎖であるのに対し、ヘミセルロースは分枝構造の分子である。

リグニン： 複雑な芳香族ポリマー。植物の細胞壁に硬度と強度を与える。セルロースやヘミセルロースのような糖鎖構造は持たないが、植物の細胞壁でこれらのポリマーをつなぐ働きをしている。

多糖類： 多数の糖類がつながった重合鎖。

生成物： 酵素が基質に働いて生成される化合物または物質。

基質： 酵素がこれに作用して生成物を生成する物質。

付録 F
バイオ燃料について議論する

実験後のディベート授業

バイオ燃料の製造に作物を利用することについて、反対する人は多くいます。燃料に作物を利用することで、人や動物の食料となる作物や農地の利用分が減るという理由からです。作物の非可食部が燃料に使われてしまい、天然肥料として農地に残されなかったら、農地から必須栄養素がなくなってしまう、という懸念も多くあります。一方でセルロース系エタノールに賛成する意見として、トウモロコシ茎葉などの作物の非可食部や、スイッチグラスなどの被覆作物を利用することは環境に良い、という意見があります。このような食料や飼料を製造する際の廃棄物を集め、エタノール生成に利用することで、カーボンニュートラルな輸送燃料が得られると考えられます。さらに、世界中の多量のバイオマスは植物のセルロース部分に含まれているため、これは石油と同様、再生可能な燃料資源となります。そこで、このような問題の議論を促すためのディベート授業についても説明します。

1日目：ステージを設定する

クラスを2つに分け、一方のチームは、バイオ燃料生成にセルロース系エタノール技術を開発・利用することに賛成、もう一方は反対とランダムに割り振ります。ディベートの形式を説明し、各チームのキャプテンを選びます。

2〜5日目：生徒による研究

- 生徒は次ページに示す賛否データシートを使って、バイオ燃料生成にセルロース系エタノール技術を開発・利用することについて研究します（宿題にしてもよいでしょう）。
- チームが、メンバー全員の研究結果をまとめます。
- チームが4分間の「始めの意見」書を書いて、発表者を割り振ります。

6日目：ディベート

ディベートの形式

「始めの意見」： バイオ燃料生成にセルロース系エタノールを利用することに賛成のチームが、セルロース系エタノール技術の利点を概説します（4分間）。

休憩： 反対のチームが、賛成の意見に対して欠点と思われる部分を、質問リストとしてまとめます（2分間）。

質問： 反対チームが質問を発表します（2分間）。

「始めの意見」： バイオ燃料生成にセルロース系エタノール技術を利用することに反対のチームが、セルロース系エタノール技術が認められない理由を概説します（4分間）。

休憩： 賛成のチームが、反対の意見に対して欠点と思われる部分を、質問リストとしてまとめます（2分間）。

質問： 賛成チームが質問を発表します（2分間）。

反証： 賛成チームが、反対チームからの質問への答えを発表します（2分間）。

反証： 反対チームが、賛成チームからの質問への答えを発表します（2分間）。

「終わりの意見」： 反対チームの見解（3分間）

「終わりの意見」： 賛成チームの見解（3分間）

評価基準

「始めの意見」について

4 = 説得力があり、構成／研究／発表もたいへんよい。
3 =構成／研究／発表はよい。
2 =構成／研究／発表はまずまずである。
1 =構成が悪く、研究も部分的に間違っており、発表もよくない。

質問について

4 = 研究に基づいて質問が熟考されており、正当な問題点をあげ、発表もよい。
3 = 質問がいくらか考えられており、いくつかの問題点をあげ、発表もよい。
2 = 質問が研究に基づいたものでなく、正当な問題点をあげておらず、発表もよくない。
1 = 質問が問題と無関係で、正当な問題点をあげておらず、発表もよくない。

反証

4 =研究内容を使って、質問に直接的に反証している。
3 =研究内容を使って、質問に部分的に反証している。
2 =不適切に研究を使って質問に反証しようとしている。
1 =質問に反証していない。

「終わりの意見」

4 =「終わりの意見」に説得力があり、構成、発表も優れている。
3 =「終わりの意見」の構成、研究、発表が優れている。
2 =「終わりの意見」の構成、研究、発表がまずまずである。
1 =「終わりの意見」にまとまりがなく、研究が一部間違っており、発表もよくない。

チームとしての作業（他のメンバーからの評価）

4 =十分に参加し、チームに貢献している。
3 =参加してチームに貢献している。
2 =部分的に参加し、いくらかは助けている。
1 =ほとんど参加や手助けをしていない。

賛否データシート

バイオ燃料生成にセルロース系エタノール技術を使用するべき理由をリストにします（参考資料も記載します）。

バイオ燃料生成にセルロース系エタノール技術を使用するべきではない理由をリストにします（参考資料も記載します）。

賛成のチームは、反対意見に反証する研究を探します。反対のチームは、賛成意見に反証する研究を探します。これらを「始めの意見」と「終わりの意見」に織り込みます。

付録 G
先生用答案ガイド

実験前の問題

1. 酵素とはどのような種類の分子のことですか？

   酵素とは通常、アミノ酸からなるタンパク質分子です。一部、核酸からなる酵素もあります。

2. 酵素の形状がその機能に重要なのはなぜですか？

   酵素の活性部位は、基質分子がそれにぴったりと入るような正しい形状をしている必要があります。タンパク質の一次構造がその二次構造、三次構造、また該当する場合は四次構造を決定します。アミノ酸の化学基が水素結合、イオン結合、共有結合、ファンデアワールス結合をして、特定の形状をつくります。活性部位に含まれるアミノ酸のR基が、酵素の最も重要なアミノ酸です。基質内の結合を作ったり切断したりする、電子密度のシフトを担う化学基だからです。これらのアミノ酸が正しい方向になければ、活性部位は反応を触媒することができません。

3. 酵素はどのようにして化学反応を加速させますか？

   酵素は、基質分子の位置を決め、活性化エネルギーを下げることで化学反応を加速させます。活性化エネルギーとは、基質分子を遷移状態（不安定な中間体）にするために必要なエネルギー量のことです。酵素は遷移状態を安定化し、遷移状態分子のエネルギー量を低下させます。これにより、各基質分子が生成物に変換されるために必要なエネルギーが少なくなるため、反応は速くすすみます。

4. この実験で使う酵素の名前は何ですか？

   セロビアーゼ（セルラーゼの1種）、別名βグルコシダーゼです。

5. この酵素の実用的、工業的な用途を1つ答えなさい。

   燃料用セルロース系エタノールの生成。

6. この酵素の天然の生成物は何ですか？

   グルコース

7. この酵素の天然の基質は何ですか？

   セロビオース（二糖類）

8. 一定時間の生成量はどのようにして求めることができますか？

   人工基質がセロビアーゼにより分解されると、この生成物が塩基性溶液の存在下で黄色になります。分光光度計または目視により、この黄色の濃さを、既知量の生成物を含む標準液と比較し、測定することができます。

9. 生成速度はどのようにして測定しますか？

時間の関数として生成物をプロットしたグラフ（時間とともに増加）を作成し、その初期の傾きを求めることで、一定時間内の生成量を算出します。一定時間での反応速度は、Y値の変化（2つの時点の生成量の違い）をその時間間隔で割って求めることができます。これにより、nmoles/分単位の速度が得られます。

実験1：分析問題

1. 反応が起きている間、酵素反応液とコントロール反応液の入ったコニカルチューブに何か変化を観察しましたか？

   なにも観察されません。溶液は透明で、目に見える変化はありません。

2. 酵素／基質の混合液を反応停止液に加えた後、各キュベットの溶液に何が起きましたか？

   酵素を含む溶液は黄色になります。酵素と基質が混ざっている時間が長いほど、黄色が濃くなります。酵素を含まないコントロールキュベットでは、変色を認めません。

3. この実験で起きた化学反応を説明しなさい。

   この人工基質はp-ニトロフェノール・グルコピラノシドです。酵素はこの分子を、グルコースとp-ニトロフェノールに分解します。

4. 酵素が加えられていないコントロールに比べた、酵素触媒反応液中の生成物の量を説明しなさい。

   反応に酵素が含まれない場合、8分後にも検出可能な生成物は得られません。酵素が含まれる反応では、8分後に約100 nmolの生成物が得られます（すなわち410 nmでの吸光度が1.6になります）。

5. 15分後で調べたら、8分後に調べたときと比べて生成量は増えると思いますか？それはなぜですか？

   それぞれの時間間隔で生成量は増えます。利用できる基質量が限られる量になるまで、生成物は一定速度で生成されると予想されます。その後生成速度は下がり、最終的にゼロになります。

6. 酵素により生成される生成量（単位：nmol）は、どのように推定しますか？

   サンプルと、既知濃度の生成物を含む標準液の黄色を目視で比較します。

7. サンプルにより吸収される光線量は、なぜ生成量に比例するのですか？

   生成物は反応停止液の存在下では黄色に変色します。黄色が濃くなると、生成物も多いということです。分光光度計では、サンプルが（410 nmの波長で）吸収した光線量を測定します。サンプルの黄色が濃いほど、サンプルが吸収する光量も多くなります（多くの生成物が生じたということです）。

8. 測定した吸光度から初期生成速度を求めなさい。**ヒント：**生成速度は吸光度の変化で測定されるもので（単位／分またはnmol/分）、0分と1分の間の線の傾きです。

   サンプルの生成速度= 12.5 nmol/分すなわち0.2吸光単位（AU）/分。

9. 生成速度は時間によっても一定ですか？ヒント：線の傾きは一定ですか？それとも変化していますか？

早い時点では線の傾きは一定です。つまり、この時間は生成速度が一定ということです。遅い時点では生成速度は若干下がるはずです。反応が完了すると速度は最終的に0になります。

実験2：分析問題

1. 各温度での反応について、どのように初期速度を求めることができますか？

初期速度は、0～2分後の吸光量を2（分）で割って求めます。これは生成物-時間曲線の、初期の線の傾きでもあります。

2. この酵素の至適温度は何℃だと思いますか？それはなぜですか？

この酵素は37℃で最もよく働くようです。この温度で生成速度が最高だからです。
注： 速度が上がり続けたままという結果が得られた場合、生徒は至適温度を予測できないかもしれません。試験温度より僅かに高温であれば予想できるかもしれません。

3. 高い温度で化学反応が速く進むのはなぜですか？

分子の動きが速く（運動エネルギーが高い）、分子の衝突回数が増えるからです。基質の平均運動エネルギーが高いため、遷移状態に達するために必要な活性化エネルギーをもつ基質分子が多くなります。

4. 低い温度で化学反応が遅く進むのはなぜですか？

分子の動きは低温でゆっくりになります。したがって衝突回数が減り、分子が遷移状態に達するのに十分なエネルギーをもたないと考えられます。

5. 超高温ではほとんどの酵素反応の速度は低下しますが、それはなぜですか？

大半の酵素はタンパク質です。タンパク質は高温で変性してしまいます。これはアミノ酸間の弱い結合が分裂し、タンパク質がその三次構造を失うためと思われます。高温では水素結合、イオン結合、ファンデアワールス結合などの結合が分解する可能性があります。これによってタンパク質の三次および二次元構造が壊れることになります。共有結合は残ります。三次元構造に関わる共有結合は、システイン（アミノ酸）間のジスルフィド結合のみです。

6. もしあなたが科学者で、この酵素を使ってグルコースを製造しようという場合、何℃でこの反応を進めるべきですか？

実験では、この酵素は37℃で反応を最も速くしました。しかし省エネのためには、さらに低い温度で反応を進めることが効率的かもしれません。

7. この酵素を産生する微生物は、どのような環境で生息していると思いますか？
その理由を説明しなさい。

この酵素は熱に安定であるため、この微生物は暖かい環境で生息している可能性があります。

チャレンジ問題

1. 酵素の三次元構造内の結合で、高温で切断されるものはどのような結合ですか？切断されないものはどの結合ですか？

高温で分解される結合は水素結合、イオン結合およびファンデアワールス結合です。水素結合は分解されません。

2. R基間の共有結合は、どのアミノ酸の間で起きていますか？

システイン

3. 最大の生成速度となる最高温度を使ったときのデメリットは何でしょうか
反応に温度を加えるにはエネルギーが必要です。セルロース系エタノールを生成する最終目的の1つはエネルギーの削減ですから、より長く、よりエネルギー効率のよい工程の方がメリットがあるかもしれません。

実験3：分析問題

1. 各pHに対する初期反応速度はどのように求められましたか？

初期反応速度とは、初期の時間間隔での生成量を、その初期の時間間隔で割った値です。生成量-時間曲線の初期の線の傾きと同じでもあります。

2. この酵素の至適pHはいくつだと思いますか？それはなぜですか?

この酵素の至適pHはpH5近くです。pH 5.0で初期生成速度が最高であるというデータから、そのように決定されます。

3. 超高pHまたは低pHではほとんどの酵素反応の速度は低下しますが、それはなぜですか？

著しいpHの変化によって、酵素を三次元構造に保っていた結合が切断される可能性があります。活性部位は同じ形状を保てなくなり、したがって反応を触媒することができません。至適pHから上下に変化することで、酵素の活性部位の電荷が変化するかもしれません（塩基性pHでは負の電荷を、酸性pHでは正の電荷を帯びやすくなります）。例えばカルボキシル基のR基は、酸性の環境ではCOOHに、塩基性の環境ではCOO^-になり、またR基にNH_3が付いているアミノ酸は、酸性の環境ではNH_4^+となります。

4. この酵素を産生する微生物は、どのような環境で生息していると思いますか？その理由を説明しなさい。

このpHレベルで活性の高い酵素を産生する細菌や菌類には、レッドウッドの森の沼や土壌、また堆肥のような酸性の環境が適しているはずです。

実験 4：分析問題

1. 酵素量によって初期反応速度は変化しますか？それはなぜか、自分のデータを使って説明しなさい。

   酵素量が増えるほど（酵素量が過剰になるまで）初期速度は上昇することになります。

2. 最初の基質量が同じで、反応時間を十分にとった場合、酵素量によって最終生成量は変化しますか？

   いいえ、基質の量が全体的な生成量を決定します。酵素濃度が低い場合、生成に必要な時間は長くなりますが、最終的には同じ生成量になります。

3. もしあなたが科学者で、セルロースから糖を製造する加水分解工程に使う酵素濃度を決定する責任者であったら、高濃度の酵素を使用するメリットは何だと思いますか？反対に、高濃度の酵素を使ったときのデメリットは何だと思いますか？

   高い酵素濃度では生成が速く進みます。しかし酵素にはコストがかかります。適当な時間内で生成を進める、最低量の酵素を使用するべきです。どのような酵素濃度で（過剰ではなく）、最大反応速度を得られるかを調べる試験を行うべきです。過剰な酵素を使うことは無駄になり、工程全体のコスト効率を下げることになります。

実験 5：分析問題

1. 基質量によって初期反応速度は変化しますか？

   基質量が増えると（過剰量になるまで）生成速度は上昇します。過剰な基質が存在すると、基質濃度がさらに高くなりますが、生成速度に違いは生じません。

2. 基質濃度の変化が生成速度にどのように影響するか、類似例を挙げるか絵に描いて説明しなさい。

   ジャガイモをスライスして冷凍のフライドポテトを製造する工場を考えてみます。ジャガイモが基質で、フライドポテトが生成物です。ジャガイモが非常に少なくて切断機が多い場合、製造速度は低いものです。機械にかけるジャガイモの数を増やすと、生産量は増えます。しかし、すべての切断機がフル稼働するようになると、ジャガイモを増やしてもそれ以上生産量は増えません。

3. 反応時間を十分にとった場合、基質量によって最終生成量は変化しますか？

   はい、基質量は生成量に直接影響します。セロビアーゼでセロビオースを切断する場合、反応に加えるセロビオースが増えると、最終生成物であるグルコースも増えます。

実験 6：分析問題

1. 自分たちのキノコ抽出液は基質を分解しましたか（つまり、黄色の生成物が得られましたか）？

   答えは様々でしょう。活性を認めるキノコはシイタケ、エノキ、ホワイトボタン（白いマッシュルーム）、クリミニキノコ（茶色いマッシュルーム）、オイスターキノコ（ヒラタケ）などです。酵素は熱、pH、プロテアーゼにより分解されますから、キノコの処理や採取してからの時間（たとえば酢漬け、乾燥、スーパーで買った新鮮キノコ、長い間放置されて粘性が出たキノコなど）も結果に影響すると思われます。

2. これまでの実験と異なるブランクを使ったのはなぜですか？ヒント：キノコが本来黄色であったら、吸光度の読取り値にどのような影響があったでしょう？

   以前の実験では酵素抽出液に再懸濁バッファーを使っていましたが、この場合の酵素抽出液は違うものです（抽出用バッファー）。この新しいバッファーの吸光度が影響する可能性も考慮し、またキノコ抽出液自体にも色が付いている可能性もあるためです。キノコ自体が黄色いこともあるでしょう。

3. 自分たちのキノコ抽出液の初期反応速度と、このキットに含まれている酵素のそれを比較しなさい。これまでpH、温度および酵素濃度の影響について学習しましたが、それらから、今回の酵素抽出液が初期反応速度に影響しただろういくつかの要素を説明できますか？

   答えは様々でしょう。この酵素抽出液で初期反応速度が高い場合は、実験で使用したものより酵素が多く含まれていたために初期速度が速くなったという者、この抽出酵素が実験で使用した酵素より室温での機能が高いという者、この抽出液が実験で使用した酵素より設定pHでの機能が高いという者もいるでしょう。

4. 科学者たちは、工業用の工程に使用することができる酵素源を常に探しています。あなた自身が、バイオ燃料用のエタノール生成にセロビアーゼ源を選ぶ場合、酵素源としてどのような種類の生物を探しますか？
   ヒント：バイオ燃料の製造においてエタノールに変換されるグルコースを生産するためには、高温かつ低pHで反応が生じる必要があります。

   高温かつ低pHで生息する微生物、たとえば堆肥中の細菌や温泉細菌などを探すと思います。堆肥中の菌類や、動物のルーメンに生息する細菌などもよいと思われます。

付録 H
参考資料および追加資料

参考資料

Arnold FH and Georgiou G eds. (2003). Directed Evolution Library Creation: Methods and Protocols (Totowa: Humana Press).

GenomeWeb Daily News (2008). Genome of Termite Gut Bacteria Sequenced. http://www.genomeweb.com/genome-termite-gut-bacteria-sequenced, Accessed August 24, 2009.

Groudieva T et al. (2004). Diversity and cold-active hydrolytic enzymes of culturable bacteria associated with Arctic sea ice, Spitzbergen. Extremophiles. 6, 475–488.

Martin LJ (2008). Carbon Neutral - What Does it Mean? www.eejitsguides.com, Accessed October 14, 2009.

Montenegro M (2006). "The Big Three". http://grist.org/news/maindish/2006/12/04/montenegro/, Accessed October 14, 2009.

Science Links Japan (2009). Bacteria inside a termite. http://www.sciencelinks.jp/content/view/826/258, Accessed August 24, 2009.

Smith CM et al. (2009). Nitrogen cycling in biofuel feedstock crops of Central Illinois during establishment. http://eco.confex.com/eco/2009/techprogram/P20970.HTM, Accessed October 14, 2009.

Tiago I et al. (2004). Bacterial diversity in a nonsaline alkaline environment: heterotrophic aerobic populations. Appl Environ Microbiol 70, 7378–7387.

Additional Resources

Ceres – About Us (2007). Biofuels: Practical energy solutions are close at hand. http://www.ceres.net/AboutUs/AboutUs-Biofuels.html, Accessed August 24, 2009.

Deacon JW ed. (2006). Fungal Biology, 4th edn. (Oxford: Blackwell Publishing).

Diwan JJ (2008). Carbohydrates – Sugars and Polysaccharides. http://www.rpi.edu/dept/bcbp/molbiochem/MBWeb/mb1/part2/sugar.htm, Accessed August 24, 2009.

Genomics: GTL: Systems Biology for Energy and Environment (2006). Understanding Biomass: Plant Cell Walls. http://genomicsgtl.energy.gov/biofuels/placemat2.shtml, Accessed October 14, 2009.

Goffman E (2009). Biofuels: What Place in Our Energy Future? http://www.csa.com/discoveryguides/biofuel/review6.php?SID=708rjbi0j6uqrak1c34mehe8e4, Accessed October 14, 2009.

Huber GW and Dale BE (2009). Grassoline at the pump. Scientific American 301, 52–59.

Kemp WH (2006) Biodiesel: Basics and Beyond. (Tamworth: Axtext Press).

Liang B (2009). The Fungi Kingdom: Common Characteristics of Fungi. http://www.wisc-online.com/objects/index_tj.asp?objID=BIO304, Accessed October 14, 2009.

Lieuwen T et al. (eds). (2009). Synthetic Gas Combustion: Fundamentals and Applications. (Boca Raton: CRC Press).

MacLean HL and Spatari S (2009). The contribution of enzymes and process chemicals to the life cycle of ethanol. Environmental Research Letters 4, 1–10.

Microbiology. (n.d.). Science on the Farm. http://sci.waikato.ac.nz/farm/content/microbiology.html, Accessed October 14, 2009.

Miyamoto K ed. (1997). Renewable biological systems for alternative sustainable energy production. http://www.fao.org/docrep/w7241e/w7241e00.HTM, Accessed October 14, 2009.

Pahl, G (2008). Biodiesel: Growing a New Energy Economy. 2nd ed. (White River Junction: Chelsea Green Publishing Company).

Pandey A (2009). Handbook of Plant-Based Biofuels. (Boca Raton: CRC Press).

Ratliff E (2007). "One molecule could cure our addiction to oil". http://www.wired.com/science/planetearth/magazine/15-10/ff_plant, Accessed October 14, 2009.

Renneberg R (2008). “Sugar and Alcohol from Wood.” In Biotechnology for Beginners, pp. 180–190.

Soetaert W and Vandamme EJ eds. (2009). Biofuels. (West Sussex: John Wiley and Sons, Ltd.).

Tilman D et al. (2009). Beneficial Biofuels – The Food, Energy, and Environment Trilemma. Science 325, 270–271.

Tillotson JK (2007). Introduction to enzyme kinetics: assay of β-galactosidase. Sci. STKE. 394, tr4.

U.S. Department of Energy (2008). Bioenergy Research Centers: An Overview of the Science. Bulletin DOE/SC-0104.

Yu C (2004). Enzyme Kinetics. http://www.wellesley.edu/Biology/Concepts/Html/initialvelocity.html, Accessed October 14, 2009.

DyNAChillはLabnet Internationalの登録商標です。
LoggerPro、LabQuestおよびSpectroVisはVernier Internationalの登録商標です。
パラフィルムはAmerican National Can Companyの登録商標です。

バイオ・ラッド ラボラトリーズ株式会社
本社　〒116-0014　東京都品川区東品川 2-2-24
Tel : 03-6361-7000　Fax : 03-5463-8480
大阪　〒532-0025　大阪市淀川区新北野 1-14-11
Tel : 06-6308-6568　Fax : 06-6308-3064
福岡　〒812-0013　福岡市博多区博多駅東 2-5-28
Tel : 092-475-4856　Fax : 092-475-4858

製品の学術的なお問い合わせ
修理・メンテナンスに関するお問い合わせは
Tel : 03-6404-0331　Fax : 03-6404-0334
Mail : life_ps_jp@bio-rad.com

http://explorer.bio-rad.co.jp

M10504 1303A